



Centre de Cabrils (Barcelona)
Departament de Protecció Vegetal



Facultat de Ciències
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia
- Unitat de Botànica -

EL DECAIMIENTO DE LA VID
ENFERMEDADES DE LA MADERA RELACIONADAS CON
HONGOS DE LA FAMILIA BOTRYOSPHAERIACEAE

Soledad Martos Arias

Memoria presentada para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Junio 2008

Director: Jordi Luque i Font
Dr. en Ciències Biològiques
Dept. de Protecció Vegetal
IRTA Cabrils

Tutor: Josep Girbal Lladó
Dr. en Ciències Biològiques
Unitat de Botànica
Fac. Ciències. UAB

AGRADECIMIENTOS

Aquí está el resultado de más de cuatro años de trabajo. Durante este tiempo, ha habido muchas personas que me han ayudado a alcanzar este objetivo y ahora quisiera agradecer a todos los que, en definitiva, lo han hecho posible.

A mi director de tesis, Dr. Jordi Luque, que con entusiasmo y suma competencia me ha ido enseñando la mejor forma de abordar el proyecto de una tesis. Gracias por tu continua disponibilidad para resolver dudas y para llevar a cabo tareas de campo y de laboratorio que sin duda otros hubiesen evitado. Tu apoyo y confianza en mi han hecho posible esta tesis.

Al Dr. Josep Tarragó, Director General del IRTA, al Dr. Pere Arús y al Dr. Joan Juli Bonet, Directores del Centro de Cabrils, por darme la oportunidad de realizar esta tesis en el IRTA. A la Dra. Soledad Verdejo, Jefa del Departamento de Protecció Vegetal del IRTA de Cabrils, que puso a mi disposición todos los medios del departamento y que me apoyó con determinación a la finalización de este objetivo. A Olga Jurado y a Victoria Barnés por mantener con tanto cuidado las plantas con las que se han realizado los experimentos (nunca olvidaremos las 1.200 vides del año 2004). A todos los demás miembros del departamento (Jose, Xavier, Joan, Cinta, Amelia, Victoria, Amparo y Asun), que no pocas veces cedieron o compartieron parte de su material y de su espacio y que siempre me prestaron la ayuda necesaria. Gracias Jose por tus interesantes charlas y por alternar tus tareas de investigador con las de psicólogo.

Al "Departament d'Educació i Universitats" de la Generalitat de Catalunya y al Fondo Social Europeo por concederme la financiación para realizar esta tesis.

Al Dr. Francesc García, del Laboratori de Sanitat Vegetal del DAR, por su colaboración durante los muestreos de campo y posterior procesamiento de las muestras, su buen humor y sus bromas siempre ayudaron a sobrellevar el trabajo. En esta tarea también contamos con la ayuda de los técnicos del DAR de las diferentes DOs, gracias por facilitarnos el trabajo. Muy importante ha sido la ayuda prestada por Joan Reyes, de la Oficina Comarcal del DAR de l'Alt Penedès, que consiguió convencer a los agricultores de que dejaran sus viñedos en manos de científicos. Gracias también a todos los viticultores que pusieron a nuestra disposición sus valorados viñedos para la recogida de material y, en especial, a la familia Vidal y a la empresa Miguel Torres.

Al Dr. Alan Phillips de la Universidad Nova de Lisboa (Portugal) por todas sus aportaciones e interesantes sugerencias sobre la mejor manera de abordar la complicada taxonomía de estos hongos. Al Dr. Sergi Santamaría de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) por su ayuda para entender la jerga taxonómica y al Dr. Josep Girbal (tutor de tesis, UAB) por su continua disponibilidad.

Al Dr. Antonio Evidente de la Universidad Federico II de Nápoles (Italia) y a su equipo (Dra. Anna Andolfi, Dr. Michele Fiore y Bianca Punzo) que me enseñaron a aplicar las técnicas de química orgánica al estudio de las toxinas y que se completó gracias a la colaboración del Dr. Giuseppe Surico, la Dra. Laura Mugnai y la Dra. Francesca Peduto de la Universidad de Florencia. Gracias a ambos grupos por recibirme y acogerme con los brazos abiertos.

A los miembros del Departamento de Genètica Vegetal del IRTA que me permitieron usar el secuenciador y, en especial, a Ángel Montejo que, con amabilidad y humor, cargó mis muestras en el ABI.

A la gente del Departamento de Horticultura Ambiental del IRTA por el diseño del experimento de estrés hídrico y por el material prestado para su realización. En especial, al Dr. Xavier Aranda que me ayudó a resolver diversos problemas técnicos, a la Dra. Felicidad de Herralde y a M^a del Mar Alsina. Al Dr. Miquel Calvo, profesor titular de la UB, que me ayudó con el análisis estadístico de una parte de los datos de este experimento.

A la Dra. Rosa Raposo y a la Dra. Ángeles Aroca, del INIA (Madrid), que me prestaron las secuencias de las diferentes especies de *Phaeoacremonium* y con las que compartí muestreos, reuniones del grupo de la viña y congresos de la SEF.

A los componentes del Laboratori de Santitat Vegetal del DAR y a su responsable, Carmina Montón, que pusieron todos los medios del laboratorio a mi disposición. A Ester Torres y a Ali el Bakali que colaboraron en el trabajo de hibridación de la sonda específica y al Dr. Francesc García y a Susanna Reigada que me ayudaron a procesar las plantas del experimento de susceptibilidad varietal.

A todos aquellos que forman y han formado parte de la Federación de Jóvenes Investigadores (FJI/Precarios) y de D-Recerca (asociación catalana). Gracias por vuestra labor para mejorar la situación del personal investigador en formación y por dignificar la tarea de los doctorandos. ¡Ningún investigador sin contrato!

A los compañeros y amigos de la caseta por compartir tantas cosas... momentos de alegría, vividos de forma intensa, pero también momentos difíciles que se han combatido con largas charlas y tiernos abrazos. Me cuesta abandonar este lugar porque sé que no sois fácilmente repetibles. Gracias Rafa por hacerme reír hasta llorar, por tu lenguaje quijotesco y por estar siempre ahí; gracias Sara por enseñarme tu querida lengua y, en general, por todo lo vivido y compartido (gracias por marcarme el camino); gracias Amaia por la chispa que tienes; gracias Laura por tu humor sarcástico que ha dado frases míticas; gracias Rosa por preguntar en el momento justo; gracias Kathy por hablar con esa dulzura; gracias Lorena por escuchar desde el principio y gracias Nati por reír incondicionalmente. No me quiero olvidar de los anteriores inquilinos de la caseta con los que formamos una gran familia, Ana del Cueto, Marta Busquets, Cristina, Sònia, Meritxell, Amparo Viera, Miguel Arregui y Miguel Louis. Tampoco olvidaré a los parientes más cercanos, con los que tanto se ha compartido, Job, Jordi Sabaté, Marta Pitet, Pepa y Ester Pons, Mimar, Mireia, Llum, Víctor, Óscar, Anna Barba, Montse Prat, Oriol, Marta (Cervantes), Carolina, Chelo, Irene y Lola.

A mi gente de Madrid que ha supuesto un apoyo fundamental para llevar adelante esta tarea: a la familia Aguilar-Fuentes (Alberto, Eva, Clara y el futuro nuevo miembro), Marieta, Vera, Carmen, Graci, Miguita, Michele, Óscar, Rubén y Ricardo, gracias por esos encuentros grasapardosos, en los que no se respeta el *turn-taking* y que han servido para mantenernos unidos a pesar de las distancias. A Pablo que estuvo muy cerca, y que lo seguirá estando, tu sabiduría ha sido siempre una fuente de aprendizaje; gracias por tu ayuda y tu apoyo, ya sabes que esta tesis es un poco tuya. A Fer, mi argentina más melancólica, con la que tanto he compartido y a la que siempre estaré unida. Y a Carlos, que en estos últimos meses ha puesto en mi vida la pizca de sal que necesitaba; gracias por tu discurso encendido y por las dosis de dulzura y paciencia.

A todos aquellos que me habeis descubierto lo maravillosa que es la amistad: Ana, Ángela, Montse, Marta, Felisa, Lidia, Paco, Carol, Dani, Nachete, Juancho, Patu, Patri, Julio, Aurélie, Pancho, Ceci, Hauke, Elisa, Michele, Angelo, Bianca, Alessio y un largo etcétera. Gracias por todo lo compartido y por lo que compartiremos.

Y por último, a mis padres que durante todo este tiempo me han ayudado incondicionalmente, apoyándose siempre en las decisiones que he tomado aunque la mayoría de las veces implicase alejarnos físicamente. Para mí han sido siempre un referente de bondad, generosidad y honestidad. Gracias de todo corazón.

RESÚMENES	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Origen y diversidad de la vid	5
El cultivo de la vid	6
Enfermedades y plagas de la vid	6
Las enfermedades de madera de la vid	9
Las enfermedades de madera de la vid en España	14
Las especies de Botryosphaeriaceae patógenas de vid	15
Objetivos	21
Bibliografía	22
1. SÍNTOMAS Y HONGOS ASOCIADOS A LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE LA VID EN PLANTA ADULTA EN CATALUÑA	27
1.1 Introducción	28
1.2 Material y métodos	29
1.3 Resultados	31
1.3.1 Sintomatología de las enfermedades de madera	31
1.3.2 Hongos asociados a las lesiones de madera	36
1.4 Discusión	39
1.5 Bibliografía	45
2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE PRESENTES EN VID	49
2.1 Introducción	50
2.2 Material y métodos	51
2.2.1 Estudio morfológico	51
a) Estructuras reproductoras	51
b) Tipología y crecimiento de las colonias	52
2.2.2 Estudio molecular de las regiones ITS, EF y β -tubulina	53
a) Aislados fúngicos	53
b) Extracción de ADN a partir de micelio	53
c) Amplificación de las regiones ITS, EF y β -tubulina	54
d) Purificación de los amplicones	55
e) Secuenciación de los amplicones	55
e1) Reacción de PCR de secuenciación	55
e2) Precipitación del ADN	55
e3) Secuenciación	56
f) Identificación molecular	56
2.2.3 Análisis filogenético de especies de Botryosphaeriaceae	56
2.2.4 Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante amplificación cooperativa, hibridación <i>dot blot</i> y revelado colorimétrico	57
a) Aislados fúngicos y material vegetal	58
b) Diseño de la sonda de hibridación	58
c) Amplificación mediante Co-PCR	59
d) Detección colorimétrica mediante hibridación <i>dot blot</i> de los amplicones	60
d1) Fijación de los amplicones a la membrana	61

d2) Prehibridación	61
d3) Hibridación	61
d4) Detección colorimétrica	61
e) Sensibilidad de la técnica	62
2.3 Resultados	62
2.3.1 Identificación y caracterización morfológica de especies de Botryosphaeriaceae	62
2.3.2 Identificación y caracterización molecular y filogenia de especies de Botryosphaeriaceae	68
2.3.3 Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante amplificación cooperativa, hibridación <i>dot blot</i> y revelado colorimétrico	74
2.4 Discusión	78
2.4.1 Identificación de Botryosphaeriaceae	78
2.4.2 Nueva técnica de detección específica para Botryosphaeriaceae	82
2.5 Bibliografía	85
3. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS FITOTÓXICOS DE CINCO ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE	89
3.1 Introducción	90
3.2 Material y métodos	91
3.2.1 Condiciones de cultivo de las especies fúngicas	91
3.2.2 Procedimientos químicos generales	92
3.2.3 Separación de las fases acuosa y orgánica de los filtrados del cultivo	93
3.2.4 Análisis de la fase acuosa	93
a) Diálisis de los filtrados del cultivo	93
b) Obtención de los exopolisacáridos de <i>Neofusicoccum luteum</i> y <i>N. parvum</i>	93
c) Análisis de los exopolisacáridos de <i>Neofusicoccum parvum</i>	94
3.2.5 Análisis de la fase orgánica	94
a) Cromatografía en columna de los extractos orgánicos de <i>Neofusicoccum luteum</i> y <i>N. parvum</i>	94
3.2.6 Pruebas de fitotoxicidad	95
a) En planta de tabaco	95
b) En hoja de vid	95
c) En plántula de tomate	96
3.3 Resultados	96
3.4 Discusión	104
3.5 Bibliografía	107
4. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE EN VID	111
4.1 Introducción	112
4.2 Material y métodos	113
4.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos	113
4.2.2 Pruebas de patogenicidad	114
4.2.3 Análisis de datos	115
4.3 Resultados	115
4.3.1 Seca del sarmiento	117
4.3.2 Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos	118
4.3.3 Necrosis vasculares	120
4.4 Discusión	124
4.5 Bibliografía	128

5. SUSCEPTIBILIDAD DE DIVERSAS VARIEDADES Y PORTAINJERTOS DE VID FRENTE A DISTINTAS ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE	131
5.1 Introducción	132
5.2 Material y métodos	133
5.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos	133
5.2.2 Pruebas de patogenicidad.....	134
5.2.3 Análisis de datos	135
5.3 Resultados.....	135
5.3.1 Seca del sarmiento.....	136
5.3.2 Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos	139
a) Portainjertos	139
b) Variedades de uva	141
5.3.3 Necrosis vasculares	142
a) Portainjertos	142
b) Variedades de uva	144
5.4 Discusión	146
5.5 Bibliografía	149
6. HUÉSPEDES ALTERNATIVOS DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE PROCEDENTES DE VID	151
6.1 Introducción	152
6.2 Material y métodos	153
6.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos	153
6.2.2 Pruebas de patogenicidad.....	155
6.2.3 Análisis de datos	156
6.3 Resultados.....	156
6.4 Discusión	163
6.5 Bibliografía	166
7. EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO Y LA INOCULACIÓN CON <i>Neofusicoccum parvum</i> EN <i>Vitis vinifera</i>	169
7.1 Introducción	170
7.2 Material y métodos	171
7.2.1 Material vegetal	171
7.2.2 Diseño experimental	172
7.2.3 Sistema de riego e inoculación con <i>Neofusicoccum parvum</i>	172
7.2.4 Variables estudiadas	173
7.2.5 Análisis de datos	177
7.3 Resultados.....	178
7.3.1 Crecimiento vegetal.....	178
7.3.2 Relaciones hídricas.....	182
7.3.3 Desarrollo del patógeno <i>Neofusicoccum parvum</i>	184
7.4 Discusión	184
7.5 Bibliografía.....	187

Índice

CONCLUSIONES GENERALES	191
ANEXO 1	195
Descripción morfológica de las especies de Botryosphaeriaceae empleadas en los diferentes capítulos.	
ANEXO 2	205
Tabla de las especies citadas en los diferentes capítulos.	
ANEXO 3	211
Tabla de los códigos de referencia de GenBank para las especies empleadas en el capítulo 2.	
ANEXO 4	215
Descripción original de <i>Dothiorella viticola</i> en Mycologia 97(5), 2005, pp.1111-1121.	

RESUMEN

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae causan daños en la madera de la vid en regiones vitícolas de todo el mundo. Para caracterizar las distintas enfermedades de madera de la vid en planta adulta y para conocer el impacto de estos patógenos en Cataluña, se llevó a cabo un muestreo en viñedos afectados de diferentes denominaciones de origen catalanas. Los resultados confirmaron la existencia en Cataluña de las tres enfermedades de la vid más comunes en planta adulta (yesca, eutipiosis y BDA [*black dead arm*]), y evidenciaron asimismo la dificultad para diagnosticarlas, debido a la múltiple y frecuente concurrencia de éstas sobre una misma planta. Las especies fúngicas aisladas con mayor frecuencia fueron *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* y distintas especies de Botryosphaeriaceae. Dentro de esta familia se identificaron seis especies, siendo por orden de abundancia *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella viticola*, *Botryosphaeria dothidea*, *N. luteum* y *N. vitifusiforme*. La controversia taxonómica que presenta la familia Botryosphaeriaceae, debido a las similitudes morfológicas entre taxones, se resolvió con el estudio combinado de la morfología de los conidios de los anamorfos y la información molecular de distintas regiones del ADN. Mediante la técnica de la PCR-cooperativa y el empleo posterior de una sonda de hibridación específica, se desarrolló una herramienta molecular de gran sensibilidad para la detección rápida y rutinaria de las especies de Botryosphaeriaceae. La sonda se diseñó sobre la región nuclear del ITS (espaciadores internos de transcripción) del ARNr, e identificó de forma específica a un grupo de siete especies de Botryosphaeriaceae (las seis aisladas de vides catalanas más *Diplodia mutila*). Profundizando en la caracterización de la familia, se estudió la capacidad de cinco especies (*B. dothidea*, *Di. seriata*, *Do. viticola*, *N. luteum* y *N. parvum*) para producir micotoxinas. Todos los aislados estudiados produjeron compuestos hidrofílicos fitotóxicos, aunque *N. luteum* y *N. parvum* destacaron por la fitotoxicidad que también mostraron sus compuestos lipofílicos. Esto corroboró los resultados de las pruebas de patogenicidad, en las que *N. luteum* y *N. parvum* mostraron una gran virulencia. *Dothiorella viticola*, *N. vitifusiforme* y *Di. seriata* mostraron una virulencia débil o nula, mientras que *B. dothidea* mostró un carácter patogénico intermedio. Sobre la susceptibilidad del hospedador a los distintos patógenos, se observó que el portainjerto Ru140 fue el menos susceptible y el 41B el más susceptible, mientras que las seis variedades de uva ensayadas (Cabernet-Sauvignon, Garnacha, Macabeo, Parellada, Tempranillo y Xarel·lo) no mostraron diferencias claras de susceptibilidad. Se constató que algunas especies vegetales que comparten su hábitat con la vid, como almendros, encinas, jaras, melocotoneros y nogales, son susceptibles a algunas especies de Botryosphaeriaceae, y que por tanto podrían actuar como hospedadores alternativos de los patógenos. De los factores abióticos que podrían afectar al desarrollo de las enfermedades se estudió el estrés hídrico. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el estrés hídrico como el patógeno *N. parvum* alteraron parámetros fisiológicos y de crecimiento de la vid, aunque no se observó un efecto combinado de ambos sobre la planta. Además, la longitud de las necrosis vasculares causadas por *N. parvum* no aumentó significativamente con el estrés hídrico, confirmando que *N. parvum* es un patógeno primario y no un patógeno de debilidad.

RESUM

Els fongs de la família Botryosphaeriaceae causen malalties de fusta de la vinya en regions vitícoles de tot el món. Per a caracteritzar aquestes malalties de la vinya en planta adulta i conèixer millor l'impacte d'aquests patògens a Catalunya, es realitzà una prospecció en vinyes afectades de diferents denominacions d'origen catalanes. Els resultats confirmaren l'existència a Catalunya de les tres malalties de la vinya més comunes en planta adulta (esca, eutipiosi i BDA [*black dead arm*]), i posaren en evidència la dificultat per a diagnosticar-les, donada l'alta concomitància d'aquestes en una mateixa planta. Les espècies fúngiques aïllades amb una freqüència major foren *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* i diverses espècies de Botryosphaeriaceae. D'aquesta família s'identificaren sis espècies, per ordre d'abundància, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella viticola*, *Botryosphaeria dothidea*, *N. luteum* i *N. vitifusiforme*. La controvèrsia taxonòmica que presenta la família Botryosphaeriaceae, deguda a les similituds morfològiques dels tàxons, es resolgué mitjançant l'estudi combinat de la morfologia dels conidis dels anamorfs i de la informació molecular de diverses regions de l'ADN. Mitjançant la tècnica de la PCR-cooperativa i l'ús posterior d'una sonda d'hibridació específica, es desenvolupà una eina de gran sensibilitat per a la detecció ràpida i rutinària de les espècies de Botryosphaeriaceae. Es dissenyà una sonda a la regió nuclear de l'ITS (espaiadors interns de transcripció) de l'ARN_r, que identificà de forma específica un grup de set espècies de Botryosphaeriaceae (les sis aïllades de vinyes catalanes més *Diplodia mutila*). Aprofundint en la caracterització de la família, s'estudià la capacitat de cinc espècies (*B. dothidea*, *Di. seriata*, *Do. viticola*, *N. luteum* i *N. parvum*) per a produir micotoxines. Totes les soques estudiades produïren compostos hidrofílics fitotòxics, tot i que *N. luteum* i *N. parvum* destacaren també per la producció de compostos fitotòxics de naturalesa lipofílica. Això donà un suport addicional als resultats de les proves de patogenicitat, en les que *N. luteum* i *N. parvum* mostraren una gran virulència. *Dothiorella viticola*, *N. vitifusiforme* i *Di. seriata* mostraren una virulència feble o nul·la, mentre que *B. dothidea* mostrà un caràcter patògen intermedi. Sobre la susceptibilitat de la vinya als fongs patògens, s'observà que el portaempelt Ru140 fou el menys susceptible i el 41B el més susceptible, mentre que les sis varietats viníferes assajades (Cabernet-Sauvignon, Garnatxa, Macabeu, Parellada, Ull de Llebre y Xarel·lo) no mostraren diferències clares de susceptibilitat. Es comprovà que algunes espècies vegetals que comparteixen hàbitat amb la vinya, com ara l'ametller, l'alzina, l'estepa, el presseguer i la noguera, són susceptibles a determinades espècies de Botryosphaeriaceae, de forma que podrien actuar com a hostatgers alternatius dels patògens. Dels factors abiòtics que podrien afectar el desenvolupament de les malalties, s'estudià l'estrès hídric. Els resultats obtinguts mostraren que tant l'estrès hídric com el patògen *N. parvum* alteraren paràmetres fisiològics i de creixement de la vinya, encara que no s'observà un efecte combinat d'ambdós factors sobre la planta. A més, la longitud de les necrosis vasculars causades per *N. parvum* no augmentaren significativament en condicions d'estrès hídric, confirmant que *N. parvum* és un patògen primari i no un patògen de feblesa.

ABSTRACT

Species in the fungal family Botryosphaeriaceae are known for causing grapevine trunk diseases in grape-producer regions worldwide. Declining vineyards were surveyed in Catalonia (NE Spain) to characterize those diseases on adult plants and to identify their causing agents. Most common grapevine trunk diseases (esca, Eutypa dieback and black dead arm disease) were confirmed to occur in Catalonia. However, concurrence of symptoms in the same plant, belonging to at least two different diseases, often difficult disease diagnosis. Most frequently isolated fungal pathogens were *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* and several species of Botryosphaeriaceae. Six botryosphaeriaceous species were identified, in decreasing abundance order: *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella viticola*, *Botryosphaeria dothidea*, *N. luteum* and *N. vitifusiforme*. The controversy in the taxonomy of Botryosphaeriaceae due to confusing morphological similarities among the species was resolved by combining the study of conidial morphology and multigene nucleotide data. A sensitive tool for a rapid detection of Botryosphaeriaceae species was developed based on the co-operational PCR technique and the use of a hybridization probe. The probe was designed to target the ITS region (internal transcribed spacers) of the rRNA repeat. It identified specifically the above Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine plus *Diplodia mutila*. Five botryosphaeriaceous species were tested for mycotoxin production, namely *B. dothidea*, *Di. seriata*, *Do. viticola*, *N. luteum* and *N. parvum*. All species produced hydrophilic phytotoxic compounds, and *N. luteum* and *N. parvum* were also shown to produce low-weight lipophilic toxins. These results support the high virulence showed by *N. luteum* and *N. parvum* in the pathogenicity test. Virulence of *Dothiorella viticola*, *N. vitifusiforme* and *Di. seriata* was weak to low, while *B. dothidea* showed an intermediate virulence. In terms of host susceptibility, rootstock 140Ru was the less susceptible to the botryosphaeriaceous fungi tested while 41B was the most susceptible one. However, no great differences in susceptibility were observed among the six grapevine varieties tested (Cabernet Sauvignon, Grenache, Macabeo, Parellada, Tempranillo and Xarel·lo). Some plant species from the surroundings of vineyards, namely almond, peach and walnut trees, holm oak and rockroses, were shown to be susceptible to some Botryosphaeriaceae species. It is hypothesized that these species could act as alternative hosts for those pathogens. Hydric stress in combination with *N. parvum* infection was studied as a potential factor that could affect disease development. Physiological and growth parameters of grapevine were modified by both hydric stress and *N. parvum* main effects, but no combined effects were detected. Vascular necroses were similar in both stressed and non-stressed grapevines, therefore *N. parvum* is not considered as a weakness pathogen.

INTRODUCCIÓN GENERAL

ORIGEN Y DIVERSIDAD DE LA VID

Las vides pertenecen al género *Vitis* L. (Fam. Vitaceae), cuyo origen data del Terciario. El género se divide en dos subgéneros: *Muscadinia* ($2n = 40$ cromosomas) y *Euvitis* ($2n = 38$), perteneciendo a éste último la mayor parte de las vides cultivadas. El subgénero *Euvitis* se considera, a su vez, dividido en tres grandes grupos, según el lugar geográfico que sirvió de refugio a las vides durante las glaciaciones del Cuaternario. El grupo de Asia oriental alberga aproximadamente 20 especies de escasa relevancia en la viticultura actual. El grupo americano está compuesto por especies como *V. rupestris* Scheele, *V. riparia* Michaux y *V. berlandieri* Planchon que se convirtieron en portainjertos de las vides europeas por su resistencia a la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch; Homoptera: Phylloxeridae). El grupo europeo está compuesto únicamente por *V. vinifera* L. y representa, a nivel mundial, la totalidad de las vides cultivadas por sus frutos (Pearson y Goheen 1990; Chomé 2002).

Según algunas estimaciones, el número de variedades de vid cultivadas en el mundo oscila entre 7.000 y 10.000 (Chomé 2002). Esta gran variedad se debe a los trabajos que, desde antaño, se han realizado para la mejora de este cultivo, así como a los movimientos migratorios y a los intercambios comerciales, que han contribuido a la implantación global de algunas variedades. En España se cultivan, de forma reconocida por el Registro de Variedades Comerciales de Vid del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 204 variedades de uva y 24 portainjertos (Chomé 2002). La identificación de las variedades se realiza en base a caracteres morfológicos (ampelografía) y morfométricos (ampelometría) apoyados, en las últimas décadas, por técnicas bioquímicas o de marcadores moleculares. Para preservar el patrimonio varietal español, se han creado colecciones de vid en casi todas las comunidades autónomas, destacando las de El Encín (Alcalá de Henares, Madrid) y El Rancho La Merced

(Jerez de la Frontera, Cádiz), y que forman en su conjunto un banco de germoplasma fundamental para el desarrollo de la viticultura en nuestro país (Chomé 2002).

EL CULTIVO DE LA VID

La vid es el cultivo frutícola de mayor extensión mundial, con unos 7 millones de hectáreas cultivadas en distintos continentes (MAPA 2005). La mayor parte del cultivo se encuentra concentrado en las regiones templadas de clima mediterráneo y, en concreto, en la cuenca mediterránea europea. En España, la importancia de la viticultura en el conjunto de la economía agraria es fundamental, siendo el país con la mayor superficie cultivada del mundo y el tercero europeo en producción de uva por detrás de Italia y Francia (OIV 2004). El viñedo en España ocupa una extensión total de 1.195.000 ha, y es el cultivo que mayor superficie presenta tras los cereales de grano y el olivar (MAPA 2005). La superficie ocupada es mayoritariamente de secano, un 90%, que se reparte en unas 435 ha de vivero, 3.000 ha de uva para pasificación, 24.000 ha de uva de mesa y 1.168.000 ha de uva de vinificación. La mayor parte de las comunidades autónomas españolas se dedican al cultivo de la viña, existiendo más de 50 regiones vitivinícolas con denominación de origen. En Cataluña, el viñedo ocupa 64.500 ha, con 12 denominaciones de origen reconocidas hasta la fecha: Alella, Empordà, Conca de Barberà, Costers del Segre, Montsant, Penedès, Pla de Bages, Priorat, Tarragona y Terra Alta, junto con las zonas de las Denominaciones Cava y Catalunya, ésta última superponiéndose a las zonas de producción del resto (MAPA 2005).

ENFERMEDADES Y PLAGAS DE LA VID

Dentro de las enfermedades de la vid debidas a factores bióticos, las causadas por hongos son las más conocidas y, en general, las que mayores pérdidas económicas generan. El protista *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis Berl. & De Toni (anteriormente clasificado como un hongo) causa la enfermedad denominada *mildiu*, provocando unas lesiones amarillentas y marronas en las hojas, que en ataques severos provoca una defoliación importante y que también afecta al fruto. Entre las patologías fúngicas más importantes que afectan al fruto y a las hojas está el *oidio* (*Erysiphe necator* Schwein.). Esta enfermedad causa

unas necrosis epidérmicas blanquecinas y pulverulentas en todos los tejidos verdes que reducen el crecimiento y afectan la calidad del fruto (Pearson y Goheen 1990; Flaherty et al. 1992). La *botritis* (*Botrytis cinerea* Pers.) afecta la calidad y la cantidad de la cosecha recogida, al causar la pudrición de las bayas o la caída prematura del fruto. La pudrición negra o *black rot* (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz) forma puntos necróticos circulares de color canela en las hojas, en medio de los cuales aparecen los picnidios oscuros del hongo. En el fruto, el ataque de *G. bidwellii* es muy rápido y pasa, en pocos días, de unos pequeños puntos blanquecinos a la desecación y momificación de la baya. La enfermedad de *Phomopsis* (causada por *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.) tiene una incidencia importante en regiones con climas de humedad ambiental elevada en el momento del desborre. Las hojas infectadas presentan puntos cloróticos o de color verdoso claro, irregulares o circulares, con el centro oscuro y que pueden acabar desprendiéndose de la hoja. En la zona basal de los sarmientos aparecen lesiones que, en ataques importantes, se unen formando fisuras abiertas. El pedúnculo del racimo también se ve afectado, lo que provoca su rotura y, por tanto, la pérdida del fruto. Otra enfermedad importante de la parte aérea es la *antracnosis* (*Elsinoë ampelina* Shear), que ocurre en regiones lluviosas y húmedas. Otras patologías que causan pudrición son el *white rot* (*Coniella diplodiella* (Speg.) Petr. & Syd.) o el *ripe rot* (*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk) (Pearson y Goheen 1990; Flaherty et al. 1992). También hay reconocidos patógenos fúngicos que atacan a la madera como *Cylindrocarpon* spp., que provoca una necrosis generalizada de la base del portainjerto, y *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. y *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill., que causan pudrición en las raíces (Gubler et al. 2004; Torrell 2004; Halleen et al. 2006).

Otras enfermedades, algunas de ellas de grave impacto, se deben a la acción de bacterias, fitoplasmas y virus. La bacteria *Xylella fastidiosa* se asocia a la enfermedad de Pierce, con un impacto importante en EE.UU., sobre todo en zonas de inviernos templados. Esta enfermedad, que se propaga mediante insectos homópteros, afecta exclusivamente al xilema y causa síntomas similares al estrés hídrico. *Agrobacterium tumefaciens* se introduce en la planta a través de las heridas causadas por las heladas, provocando deformaciones en forma de agalla

en la madera (Pearson y Goheen 1990; Flaherty et al. 1992). La *flavescencia dorada* está causada por un fitoplasma, que emplea como vector a especies del homóptero *Scaphoideus*. Los síntomas característicos aparecen en verano; la planta adquiere un aspecto desparramado, con los sarmientos caídos y falta de lignificación, y los márgenes de las hojas revolutos. Las hojas de las variedades blancas se vuelven de un color amarillento-dorado, rojizo en las variedades tintas (Barrios 2004a). Otra enfermedad causada por un fitoplasma es el *bois noir* (*madera negra*), transmitido por el homóptero polífago *Hyaletthes obsoletus* Signoret y cuyos síntomas son similares a la flavescencia dorada (Barrios 2004b). Los virus también son causantes de algunas enfermedades en vid, como el *entrenudo corto infeccioso* (producido por un nepovirus), que provoca sarmientos aplastados con entrenudos de menor longitud; el *enrollado* (causado por un closterovirus), cuyo síntoma más característico es el enrollamiento del limbo y los nervios de las hojas; la *madera rizada* (ocasionada por un vitivirus), cuyo síntoma más llamativo es la formación de acanaladuras y pocillos bajo la corteza; y el *jaspeado*, que provoca alteraciones cromáticas en las hojas (Martelli 1993; Padilla 2004).

Una de las plagas más conocidas en la vid es la *filoxera*, provocada por el homóptero *Daktulosphaira vitifoliae*, que causa unas agallas características en raíz y hojas. El parásito es originario de Norteamérica y llegó a Europa en la última mitad del siglo XIX, afectando a la práctica totalidad de los viñedos europeos y causando una importante crisis vitícola. La filoxera necesita infectar de forma conjunta raíces y hojas para completar su ciclo, por eso, para su control, las vides europeas se injertan actualmente sobre portainjertos americanos resistentes. Otras plagas que causan un grave impacto económico en nuestro país son las polillas del racimo (*Lobesia botrana* Den. y Schiff., *Clysia ambiguella* Hb. y *Cryptoblabes gnidiella* Mill), sobre todo en la costa mediterránea y atlántica, y el mosquito verde (*Jacobiasca* spp.) que ha experimentado un incremento notable en los últimos años. Otras plagas comunes son el gusano blanco *Anoxia villosa* L., el gusano del alambre *Agriotes lineatus* L., las termitas que causan daños importantes en viñedos maduros, y los ácaros, como la araña amarilla (*Eotetranychus carpini* Oud.) y la araña amarilla común (*Tetranychus urticae* Koch.) (MAPA 2004).

LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE LA VID

Las enfermedades de madera de la vid constituyen un conjunto de enfermedades causadas por hongos patógenos, cuya sintomatología es múltiple, compleja, y a veces incluso confusa. Estas enfermedades tienen en común una alteración interna de la madera, lo que a menudo conlleva la muerte de la planta de forma irremediable, aunque ésta se dé en un plazo de tiempo indeterminado (García et al. 2005). Las referencias a las enfermedades de madera de la vid se remontan a la época clásica, cuando Plinio el Viejo ya las describía en sus textos de agronomía (Larignon 2004). Desde la década de los 80 del siglo XX se ha apreciado un aumento en la incidencia de estas enfermedades, y esto ha despertado un interés creciente por la investigación sobre el decaimiento de la vid y la etiología de las enfermedades relacionadas. La prohibición del arsenito sódico, tradicionalmente empleado en el control de la yesca, ha sido determinante en la creciente repercusión de estas patologías (Mugnai et al. 1999). Este producto comenzó a excluirse progresivamente de las listas de fitosanitarios permitidos debido al fuerte impacto ambiental que genera y por su efecto cancerígeno en humanos (Trouba et al. 2002). En España, se prohibió definitivamente su uso en el año 2003.

La yesca, reconocida como una de las enfermedades más destructivas de madera de la vid, se ha convertido en un problema muy importante en todas las zonas vitícolas del mundo (Larignon 2004). Este síndrome puede tener una evolución lenta (fase crónica) o bien rápida (fase aguda) (Mugnai et al. 1999). La expresión de los síntomas en la fase crónica tiene una naturaleza errática y su aparición puede no ser constante a lo largo de los años (Di Marco et al. 2000). En plantas adultas, el síntoma interno más característico es una pudrición blanda debido a la degradación progresiva de la madera, hasta convertirse en una masa esponjosa de color amarillento (Figuras A-B) (Mugnai et al. 1999). Sobre la hoja, se observan manchas cloróticas entre los nervios, o a lo largo del margen, que suelen derivar en necrosis (Figura C) (Mugnai et al. 1999). La fase aguda del síndrome, o apoplejía, suele aparecer a mediados de verano y desemboca en una muerte rápida de la planta en días o incluso horas (Larignon 2004). Las plantas que sufren este fenómeno apopléjico presentan las hojas completamente secas y unidas al sarmiento.

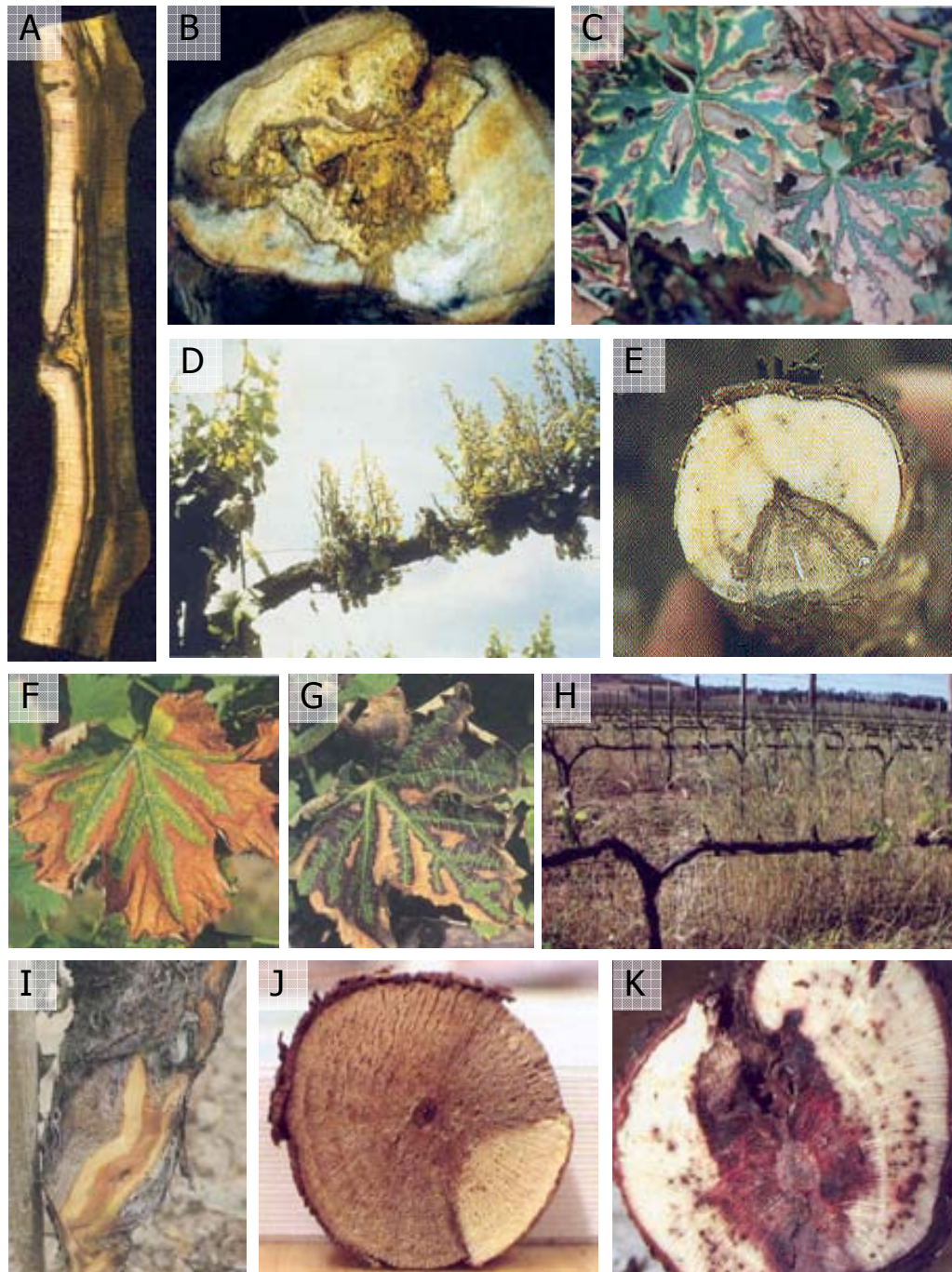


Figura A (Surico et al. 2006): Lesiones en madera, en corte longitudinal, asociadas con la yesca. **Figura B** (Armengol et al. 2001): Pudrición blanda en un estado avanzado de la yesca. **Figura C** (Surico et al. 2006): Necrosis foliares de la yesca sobre una variedad de uva tinta. **Figura D** (Pearson y Goheen 1990): Crecimiento reducido de sarmientos en vides afectadas de eutipiosis. **Figura E** (Pearson y Goheen 1990): Necrosis sectorial, en forma de V, en una planta con eutipiosis. **Figura F** (Larignon y Dubos 2001): Necrosis foliar asociada al *black dead arm* (BDA) en una variedad de uva blanca. **Figura G** (Larignon y Dubos 2001): Necrosis foliar asociada al BDA en una variedad de uva tinta. **Figura H** (Van Niekerk et al. 2006): Crecimiento reducido y ausencia de brotación en plantas afectadas de BDA. **Figura I** (Larignon y Dubos 2001): Banda marrón visible externamente al eliminar la corteza de una planta con BDA. **Figura J** (Van Niekerk et al. 2006): Necrosis sectorial, en forma de V, de una planta con BDA. **Figura K** (Van Niekerk et al. 2006): Punteaduras marrones y necrosis asociadas al BDA.

En la yesca se reconoce la participación de dos tipologías distintas de hongos patógenos: por un lado los patógenos vasculares, como *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams y distintas especies de *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf., que actúan como patógenos primarios (Larignon y Dubos 1997). Por otro lado, los colonizadores secundarios como los basidiomicetos del género *Fomitiporia* Murrill, *Fomitiporella* Murrill e *Inocutis* Fiasson & Niemelä (Fischer 2002; Fischer 2006) y *Stereum hirsutum* (Will.: Fr.) S.F. Gray, causantes de la pudrición (Larignon y Dubos 1997). En la actualidad, sin embargo, no se considera que *S. hirsutum* tenga una implicación importante en la yesca. Aunque se conocen los agentes causales, todavía no se conoce con exactitud el papel de los microorganismos en el proceso de infección y cuáles son los factores que influyen particularmente en el desarrollo de la yesca (Di Marco et al. 2000; Surico et al. 2006).

La eutipiosis es una enfermedad crónica de gran poder devastador, causada por el hongo *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (Carter 1991; Munkvold y Marois 1995). Los síntomas en los brotes, que se manifiestan durante la primavera, corresponden a sarmientos débiles, con entrenudos cortos, hojas pequeñas, cloróticas y con necrosis marginales, y racimos abortados (Figura D) (Moller et al. 1974). Algunos de estos síntomas externos se cree que están causados por diferentes compuestos tóxicos producidos por el hongo, como eutipina, eutipinol, metil-eutipinol, eulatacromeno, 2-iso-propenil-5-formilbenzofurano y eulatinol (Fallot et al. 1997; Mahoney et al. 2005; Lardner et al. 2006). En corte transversal del tronco o brazo afectados aparece una necrosis sectorial en forma de V, muy típica de la enfermedad, que recorre el xilema desde la parte más externa hasta la médula (Figura E) (Péros y Berger 1994; Chapuis et al. 1998).

Distintas especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae se han asociado a varias enfermedades como la excoriosis, el síndrome de decaimiento de la vid y el *black dead arm* (BDA o enfermedad del brazo muerto). Esto ha provocado cierta confusión, ya que un mismo síntoma o especie fúngica se ha asociado a varias patologías (Van Niekerk et al. 2006).

El BDA se describió en Hungría por primera vez y se asoció al hongo *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. (Lehoczky 1974). Posteriormente, la enfermedad se citó en Italia y, de las plantas afectadas, se aislaron *Diplodia mutila* y *Di. seriata* De Not. (Cristinzio 1978). No fue hasta 2001 cuando se volvió a asociar esta enfermedad con el decaimiento de vides en algunas áreas de Francia, de las que se aisló *Di. seriata* seguida de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. (Larignon y Dubos 2001; Larignon et al. 2001a). En la actualidad, esta enfermedad se relaciona con diversas especies de Botryosphaeriaceae y con numerosos síntomas no específicos, ya descritos para otras patologías de madera (Van Niekerk et al. 2006). A nivel externo, Larignon y Dubos (2001) describen unos síntomas foliares del BDA similares a la yesca, aunque con ligeros matices diferentes en la coloración de las manchas (Figuras F-G), y cuyos síntomas ya se expresan en primavera. En un estado más avanzado, las hojas se desecan completamente, se arrugan y caen, no quedando más que algunas en la parte terminal de la rama. Muy avanzada la enfermedad, se pueden ver afectadas las inflorescencias e incluso el fruto puede desecarse por completo (Larignon y Dubos 2001). Sin embargo, para otros autores, el BDA se asocia, como en el caso de la eutipiosis, con un crecimiento reducido y clorosis foliar a principios de primavera y, en una fase avanzada, con la muerte del brazo (Figura H) (Castillo-Pando et al. 2001; Van Niekerk et al. 2006). Incluso, Úrbez-Torres et al. (2006a) aislaron, de forma mayoritaria, varias especies de Botryosphaeriaceae de plantas cuyos síntomas principales eran similares a los de la eutipiosis. A nivel externo, se pueden llegar a apreciar partes del tronco necróticas, donde la corteza aparece suelta y se puede separar fácilmente con la mano (Figura I) (Lecomte et al. 2005). A nivel interno, el síntoma más típico del BDA es una necrosis sectorial, sobre el xilema de brazos y tronco, de color marrón oscuro y en forma de V, tal como ocurre en la eutipiosis (Figura J) (Van Niekerk et al. 2002). También se han descrito otros síntomas asociados a las especies de Botryosphaeriaceae, como punteaduras o necrosis oscuras, que envuelven la médula central (Figura K) (Van Niekerk et al. 2006).

En los últimos años también se viene detectando un alarmante incremento de los problemas en vides jóvenes, manifestados por un decaimiento progresivo o incluso la muerte desde el primer año de su plantación (Armengol et al. 2002). Este decaimiento en planta joven

recibe el nombre de enfermedad de Petri (Crous y Gams 2000). De las plantas afectadas se han aislado con frecuencia *Phaeomoniella chlamydospora* y distintas especies de *Phaeoacremonium*, como *Pm. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai y *Pm. inflatipes* W. Gams, Crous M.J. Wingf. (Scheck et al. 1998; Mugnai et al. 1999), indicando una posible conexión con la enfermedad de la yesca en plantas adultas.

No se conoce con exactitud cómo es la epidemiología de los hongos relacionados con las enfermedades de madera de la vid. Ante la dificultad de reproducir los síntomas de la yesca en ensayos artificiales, Surico et al. (2006) sostienen que deben existir tanto factores abióticos como bióticos, hasta ahora desconocidos, que concurren para llegar a producir los síntomas externos de las enfermedades. En cuanto al modo de infección de estos hongos se sabe, por ejemplo, que *Phaeomoniella chlamydospora* y *Pm. aleophilum* presentan, al menos durante una parte de su ciclo biológico, un mecanismo de dispersión aéreo (Larignon y Dubos 2000; Armengol et al. 2002), al igual que las especies de Botryosphaeriaceae (Larignon et al. 2001b). *Eutypa lata* también se dispersa a través del aire, estando muy relacionada la liberación de sus ascósporas con episodios de lluvia (Paillassa et al. 1992). Con una dispersión aérea, la vía habitual de entrada en la planta son las heridas producidas en la poda. Ya se sabe que hongos como *E. lata*, *Pa. chlamydospora* y especies de Botryosphaeriaceae se introducen en la vid a través de estas heridas (Paillassa et al. 1992; Larignon et al. 2000; Larignon et al. 2001b).

Las medidas profilácticas se han perfilado como la mejor forma para el control de estas enfermedades debido a la ausencia de un producto eficaz tras la prohibición del arsenito sódico. Las prácticas culturales más comunes son la eliminación de los restos de poda y de las cepas afectadas para reducir las fuentes de inóculo (Larignon y Dubos 2001), así como la protección de las heridas de poda con fungicidas. También es aconsejable realizar la poda en época tardía, ya que se reduce la susceptibilidad de las heridas (Munkvold y Marois 1995). Las podas de saneamiento, para eliminar la madera atacada, pueden ser un método efectivo a largo plazo si se elimina completamente la parte afectada (Di Marco et al. 2000; Sosnowski et al. 2004). En los últimos años, se están practicando tratamientos con agua caliente en las plantas

de vivero, previo a su comercialización, que están dando resultados esperanzadores para el control de *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* y *Cilindrocarpon* spp. (Armengol et al. 2007; Halleen et al. 2007). Desgraciadamente, estos tratamientos provocan, en ocasiones, fallos en el material de plantación (Waite y May 2005; Waite y Morton 2007).

LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE LA VID EN ESPAÑA

De igual forma que en el resto de países viticultores, en España también se ha incrementado el impacto de las enfermedades de madera de la vid en los últimos años (Armengol et al. 2001). A pesar de que en nuestro país todavía faltan importantes zonas vitícolas por prospectar, los muestreos existentes confirman la presencia de todas las enfermedades de madera de la vid descritas.

Los síntomas externos asociados a la eutipiosis se han destacado como los más comunes en la comarca de la Rioja Alavesa, enfermedad que fue diagnosticada por primera vez sobre vid en 1979, en Tierra de Barros (Badajoz) (Mateo y Yoller 1994). Los síntomas externos descritos como los más habituales en cinco áreas productoras de Castilla-León fueron los de la eutipiosis, seguidos de los de la yesca (Úrbez-Torres et al. 2006a). En otro muestreo desarrollado en esta comunidad, las especies más comúnmente aisladas de vides sintomáticas fueron diversas especies de Botryosphaeriaceae (sobre todo *Di. seriata*), *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* (Martín y Cobos 2007). En cuanto a la enfermedad de Petri, se han detectado viñedos con una mortalidad de plantas superior al 50% durante el primer año, con presencia consistente de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* (Armengol et al. 2002). Otro estudio ha puesto en evidencia el alto porcentaje del material procedente de viveros de nuestro país que ya viene infectado con patógenos de madera de la vid (Aroca et al. 2006). Esto indica la deficiente calidad sanitaria de las vides empleadas en las nuevas plantaciones y que proceden de plantas madre que podrían ya estar infectadas aunque, no se descarta, que se infecten durante el periodo de manipulación de las estaquillas (Armengol et al. 2002; Aroca et al. 2006).

Armengol et al. (2001) presentaron las conclusiones extraídas del análisis de muestras enviadas a la red de laboratorios oficiales de diagnóstico y que, por tanto, no proceden de una prospección intensiva. Las muestras analizadas por dichos autores, aunque no siempre asociadas a patologías de la madera, procedían de importantes regiones vitícolas como Castilla-La Mancha, Valencia, Cataluña, Aragón y Castilla-León. Los hongos diagnosticados como relacionados con enfermedades de madera de la vid fueron de mayor a menor proporción: *Di. seriata*, *Pm. aleophilum*, *Cylindrocarpon* spp., *Fomitiporia punctata* (Fr.) Murrill (probablemente *F. mediterranea*), *Pa. chlamydospora*, *B. dothidea*, *S. hirsutum* y *E. lata*. A pesar de que el BDA sólo ha sido citado como tal por García et al. (2005), posiblemente debido a que sus síntomas externos e internos son similares a los de otras patologías de madera, se puede confirmar su impacto en nuestro país basándonos en el alto porcentaje de aislamiento de especies de Botryosphaeriaceae en los trabajos de Armengol et al. (2001) y Úrbez-Torres et al. (2006a).

LAS ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE PATÓGENAS DE VID

El género *Botryosphaeria* se clasifica dentro de los Ascomicetos como perteneciente al orden Botryosphaeriales (Dothideomycetes, *incertae sedis*) y a la familia Botryosphaeriaceae (Schoch et al. 2006). Estos hongos poseen un ciclo biológico con una fase sexual (teleomorfo), poco común, y una fase asexual (anamorfo) mucho más abundante (Denman et al. 2000). El género *Botryosphaeria* fue descrito por primera vez por Cesati y De Notaris (1863) y revisado, más tarde, por Saccardo (1877). Posteriormente, los trabajos de Von Arx y Müller (1954), Eriksson (1981), Sivanesan (1984) y Schoch et al. (2006) contribuyeron a la caracterización morfológica del género y a la taxonomía y sistemática del grupo.

Desde la década de los 60, la identificación de las especies de Botryosphaeriaceae se basa principalmente en características del anamorfo (Jacobs y Rehner 1998; Phillips et al. 2002), debido a la escasez de teleomorfos en la naturaleza y a sus caracteres poco variables entre especies (Shoemaker, 1964). Sin embargo, la taxonomía de los géneros anamórficos de Botryosphaeriaceae es en ocasiones confusa, ya que algunos caracteres pueden variar según el

substrato donde se ubiquen en el hospedador (Witcher y Clayton 1963; Pennycook y Samuels 1985) o el estado de desarrollo del mismo (Von Arx y Müller 1954; Slippers et al. 2004a). En general, la diversidad de hospedadores colonizados por una misma especie y la aparición de diferentes especies sobre un mismo hospedador invalidan el uso de la asociación hospedador-hongo como un carácter taxonómico apropiado (Pennycook y Samuels 1985; Jacobs y Rehner 1998; Slippers y Wingfield 2007). Para determinadas especies, la clasificación se apoya en caracteres de las colonias tales como la morfología y la tasa de crecimiento micelial a diferentes temperaturas (Pennycook y Samuels 1985; De Wet et al. 2003). Sin embargo, estos caracteres son válidos para especies muy concretas, por ejemplo *Neofusicoccum luteum* (Pennycook y Samuels 1985; Phillips et al. 2002), y no se aplican de forma general.

Son numerosos los estudios que apoyan la división de las especies de *Botryosphaeria* en dos únicos géneros anamórficos: *Fusicoccum* Corda (que incorpora también *Macrophomopsis* Petr.) y *Diplodia* Fr. (que incluye además a *Sphaeropsis* Sacc., *Dothiorella* Sacc., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc.) Berl. & Vogl. y algunas especies de *Phoma* Westend.) (Denman et al. 2000; Phillips 2002; Alves et al. 2004; Slippers et al. 2004a). Sin embargo, debido a las diferencias filogenéticas y morfológicas (existencia de conidios estriados y paráfisis) de diversas especies en *Lasiodiplodia*, algunos autores han preferido mantener el nombre como un género distinto a *Diplodia* (Pavlic et al. 2004). Recientemente, el género anamórfico *Dothiorella* Sacc. ha sido de nuevo segregado de *Diplodia* para incluir especies con conidios oscuros y septados ya desde las primeras fases del desarrollo (Phillips et al. 2005).

Crous et al. (2006), en una revisión de la familia Botryosphaeriaceae, abordaron el análisis de las secuencias de ADN de 113 aislados, apoyado con caracteres morfológicos, que reveló la existencia de 11 clados diferentes. Esta nueva revisión, basada en el gen que forma la subunidad grande del ribosoma (LSU), ha segregado *Botryosphaeria* en diversos géneros, reservando el nombre tipo para la especie *Botryosphaeria dothidea* (anamorfo *Fusicoccum aesculi* Corda). Esta segregación era previsible ya que, según la morfología, muchos anamorfos

distintos entre sí parecían presentar un único teleomorfo. El estudio de Crous et al. (2006) no resuelve la nomenclatura de varios de los teleomorfos y opta por mantener el nombre "*Botryosphaeria*" para los teleomorfos similares a *Botryosphaeria* (clado 2). Sin embargo, analiza en profundidad las relaciones filogenéticas de los anamorfos, confirmando géneros existentes o definiendo otros nuevos.

La revisión realizada por Crous et al. (2006) sitúa en cuatro clados diferentes, de los 11 que define, a las especies de la familia Botryosphaeriaceae presentes en la vid (en concreto, los clados 1, 2, 5 y 6). En el estudio, *Diplodia* y *Lasiodiplodia* quedan agrupadas en un único clado (clado 1), sin nombre de teleomorfo definido, lo que significa que el gen LSU no resuelve la problemática de estos dos géneros anamórficos. *Diplodia* presenta conidios hialinos, que pueden septarse y pigmentarse cuando son maduros, de pared gruesa y ancho superior a los 10 µm (Phillips 2002). Por su parte, *Lasiodiplodia* presenta algunas características (conidios ornamentados) que ayudó a Pavlic et al. (2004) a no considerarlo sinónimo de *Diplodia*. Según Crous et al. (2006), el clado 2 incluye el tipo del género *Botryosphaeria* (*B. dothidea*) y a su anamorfo en *Fusicoccum* (*F. aesculi*), junto con algunas especies más (*B. mamane* D.E. Gardner y *B. corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll.). *Fusicoccum* presenta conidios hialinos, de fusiformes a elípticos, de pared delgada, normalmente aseptados y de ancho inferior a 10 µm (Phillips 2002). En el clado 6 aparecen especies con teleomorfos tipo *Botryosphaeria* y anamorfos tipo *Fusicoccum*, para los que los autores definen un nuevo género anamórfico, *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, ya que algunas especies presentan conidios oscuros, de globosos a piriformes, características ausentes en el clado 2. En el clado 5, las especies agrupadas presentan ascósporas oscuras y con un septo que los autores definen como pertenecientes a *Dothidotthia* Höhn. (teleomorfo) y con conidios en *Dothiorella*. Esta coloración y septación de las ascósporas distingue al clado 5 del resto de la familia que suele presentar, por lo general, ascósporas hialinas y aseptadas (Shoemaker 1964; Alves et al. 2004). Además, en contraste con el resto de especies de Botryosphaeriaceae, las diferencias morfológicas en las especies del clado 5 son más aparentes en el teleomorfo que en el anamorfo (Phillips et al. 2005).

Cada vez es más habitual el empleo de secuencias de múltiples genes para resolver controversias a nivel intragenérico en la familia Botryosphaeriaceae, especialmente entre taxones estrechamente relacionados. Las regiones más utilizadas en combinación con las del ITS (espaciadores internos de transcripción) son el factor de elongación 1-alfa (EF1- α) (Van Niekerk et al. 2004; Phillips et al. 2005) y la β -tubulina (Slippers et al. 2004a; Úrbez-Torres et al. 2006b). Las filogenias más recientes de Botryosphaeriaceae se basan en cladogramas de una o más secuencias de datos moleculares, sustentados siempre por los caracteres morfológicos (Van Niekerk et al. 2004; Phillips et al. 2005). Los marcadores moleculares basados en la repetición de secuencias cortas (SSR) y en la amplificación al azar de polimorfismos de ADN (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*) también están dando resultados prometedores en la diferenciación de especies crípticas de Botryosphaeriaceae (De Wet et al. 2000; Slippers 2003). Otras técnicas aplicadas para la identificación de las especies de la familia son los cebadores específicos y las enzimas de restricción que tienen como objetivo disponer de una herramienta rápida y efectiva (Alves et al. 2005; Slippers y Wingfield 2007). Sin embargo, las regiones génicas estudiadas hasta el momento no son adecuadas para distinguir entre todas las especies de Botryosphaeriaceae.

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae se distribuyen en zonas de climas templados y tropicales alrededor del planeta, encontrándose en numerosas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Barr 1972). En la actualidad se cree que la mayoría de las especies de Botryosphaeriaceae, si no todas, podrían tener una fase endofítica (Slippers y Wingfield 2007). Sus especies se han descrito, generalmente, como saprofitas y ocasionalmente parásitas (Smith et al. 1996), pudiendo causar chancros, decaimiento y otras enfermedades en hospedadores leñosos (Michailides 1991; Phillips 2000; Denman et al. 2003; Slippers et al. 2004a). En los últimos ocho años, numerosos estudios han encontrado ejemplares de Botryosphaeriaceae en *Vitis vinifera* (Castillo-Pando et al. 2001; Phillips 2002; Van Niekerk et al. 2004; Luque et al. 2005; Úrbez-Torres et al. 2006a; Úrbez-Torres et al. 2006b; Savocchia et al. 2007; Úrbez-Torres et al. 2007), así como sobre especies de *Quercus* (Sánchez et al. 2003;

Alves et al. 2004; Linaldeddu et al. 2007), *Pinus* L. (Burgess et al. 2004), Araucariaceae (Slippers et al. 2005), Mirtaceae (Pavlic et al. 2004; Slippers et al. 2004b; Barber et al. 2005; Burgess et al. 2006; Pavlic et al. 2007), Proteaceae (Swart et al. 2000; Denman et al. 2003) y Rosaceae (Slippers et al. 2007). Durante algún tiempo se ignoró la posible relación de algunas de las especies de Botryosphaeriaceae con los síntomas del decaimiento en vid aunque hace más de una década que algunas de ellas habían sido descritas en este huésped (Phillips 1998), (Phillips 2002). Phillips (2002) identificó cinco especies de Botryosphaeriaceae asociadas a enfermedades de madera de la vid en Portugal. *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips resultó ser la especie de más amplia distribución, seguida de *Di. seriata* y *N. luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, y las menos comunes, *Di. mutila* y *B. dothidea* (Phillips 2002). En la República Sudafricana, Van Niekerk et al. (2004) identificaron nueve especies del género sobre vid: *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. luteum*, *Di. seriata*, *N. parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Diplodia porosum* Niekerk & Crous, *Neofusicoccum viticlavatum* (Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum vitifusiforme* (Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *Diplodia* sp. Los dos aislados de esta última especie corresponden en realidad a *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & Luque, descrita como una nueva especie por Luque et al. (2005). En California, se han identificado hasta nueve especies de Botryosphaeriaceae asociadas al decaimiento de vides: *Di. mutila*, *Di. seriata*, *Do. viticola*, *B. dothidea*, "*Botryosphaeria*" *iberica* A.J.L. Phillips, Luque & Alves, *L. theobromae*, *N. australe*, *N. luteum* y *N. parvum* (Úrbez-Torres et al. 2006b; Úrbez-Torres et al. 2007).

La caracterización patogénica de las especies de Botryosphaeriaceae se ha visto dificultada, a su vez, por la complicada taxonomía del género (Phillips 2002). En un trabajo sobre la virulencia de varios aislados de Botryosphaeriaceae de vid en Portugal, se define por primera vez a *B. dothidea* como patógeno de viña (Phillips 1998), aunque posteriormente se vio que algunos de estos aislados correspondían en realidad a *N. parvum* (Alan Phillips, com. pers.). En un artículo posterior, Phillips (2002) consideró *N. parvum* como uno de los agentes

causales responsables del decaimiento de la vid. Van Niekerk et al. (2004) realizaron tres tipos diferentes de inoculaciones con aislados sudafricanos de Botryosphaeriaceae, entre los que destacaron *N. parvum* y *N. australe* por causar las lesiones más importantes. Otro hongo de la familia, aislado en múltiples ocasiones y asociado a decaimiento en madera de vid en Europa, Australia, Sudáfrica y EE.UU., es *Di. seriata* (Úrbez-Torres et al. 2006b). La patogenicidad de este hongo es un tema que genera controversia. Larignon y Dubos (2001) asociaron directamente a *Di. seriata* con síntomas de la enfermedad del brazo muerto en viñedos bordeleses y se considera como patógeno virulento en Chile, Australia y Sudáfrica (Úrbez-Torres et al. 2006b). Sin embargo, otros estudios lo han calificado como patógeno débil en Portugal (Phillips 1998; Phillips 2002) e incluso como un parásito secundario o saprofito en el oeste australiano (Taylor et al. 2005). Lehoczky (1974) asoció *Di. mutila* con los síntomas del BDA, sin embargo, los estudios posteriores han quitado protagonismo a este hongo como agente causal del BDA. Aunque los estudios de patogenicidad que se han realizado con esta especie son escasos, está considerada como un patógeno de vid potencialmente importante (Van Niekerk et al. 2004).

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae han despertado un notable interés científico y gran cantidad de equipos de investigación están realizando muestreos sobre extensas áreas para aislar e identificar las especies de la familia. Este intenso trabajo está dando sus frutos y cada vez es mayor el conocimiento que se tiene de las especies de Botryosphaeriaceae. Sin embargo, todavía es preciso realizar investigaciones en numerosos campos para conseguir un control eficaz de estos patógenos.

OBJETIVOS

Este trabajo ha tenido como finalidad el estudio de las especies de la familia Botryosphaeriaceae presentes en la vid en Cataluña. Para abordar este objetivo global, se estudió la etiología de las enfermedades causadas por estos hongos y otros aspectos de su biología mediante los siguientes objetivos:

1. Aislar e identificar las especies de Botryosphaeriaceae procedentes de vides catalanas empleando métodos morfológicos y moleculares.
2. Desarrollar una técnica molecular para la identificación de las especies de Botryosphaeriaceae que pueda ser empleada en la detección rápida y rutinaria de dichas especies.
3. Evaluar la capacidad de distintas especies de Botryosphaeriaceae para producir sustancias fitotóxicas en condiciones de laboratorio controladas.
4. Estudiar la patogenicidad de diferentes especies y aislados de Botryosphaeriaceae en plantas jóvenes de vid.
5. Estudiar el carácter patogénico de especies de Botryosphaeriaceae en diferentes variedades de uva y portainjertos utilizados comúnmente en Cataluña.
6. Evaluar la susceptibilidad de especies vegetales acompañantes de la vid, tanto de interés agronómico como especies naturales de ámbito mediterráneo, a la infección con especies de Botryosphaeriaceae patógenas de la vid.
7. Analizar la influencia del estrés hídrico sobre la virulencia de *Neofusicoccum parvum* y la susceptibilidad de la vid al patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, A., Correia, A., Luque, J. y Phillips, A. (2004). *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96, 598-613.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I. y Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters* 245, 221-229.
- Armengol, J., Gramaje, D., Salazar, D., López-Cortés, I., Jiménez-Jaime, A., Crespo, A., Albaráñez, E. H. y García-Jiménez, J. (2007). A hot-water treatment to control *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in Spanish grapevine nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 126.
- Armengol, J., Vicent, A. y García-Jiménez, J. (2002). El decaimiento y muerte de vides jóvenes (enfermedad de Petri) en España. *Phytoma España* 138, 91-93.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. y García-Jiménez, J. (2001). Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera de vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal* 27, 137-153.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. y Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115, 195-202.
- Barber, P. A., Burgess, T. J., Hardy, G. E., Slippers, B., Keane, P. J. y Wingfield, M. J. (2005). *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. *Mycological Research* 109, 1347-1363.
- Barr, M. E. (1972). Preliminary studies on the *Dothideales* in temperate North America. *Contributions to the University of Michigan Herbarium* 9, 523-638.
- Barrios, G. (2004a). Fitoplasmosis. Flavescencia dorada. En: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición. Coedición: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Mundi-Prensa. Madrid (España). pp. 272-277.
- Barrios, G. (2004b). Madera negra. En: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición. Coedición: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Mundi-Prensa. Madrid (España). pp. 278-279.
- Burgess, T. I., Gordon, T. R., Wingfield, M. J. y Wingfield, B. D. (2004). Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. *Mycological Research* 108, 1399-1406.
- Burgess, T. I., Sakalidis, M. L. y Hardy, G. E. S. (2006). Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. *Austral Ecology* 31, 559-566.
- Carter, M. V. (1991). The status of *Eutypa lata* as a pathogen. *Phytopathological Paper* 32, 1-59.
- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M. y Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30, 59-63.
- Cesati, V. y De Notaris, G. (1863). Schema di classificazione degle sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuito gli de Persono. *Comm. Soc. Crittogam. Ita.* 1, 177-240.
- Chapuis, L., Richard, L. y Dubos, B. (1998). Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology* 47, 463-472.
- Chomé, P. M. (2002). Catálogo de variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Chomé, P. M. (Coord.). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica (Ed.). Madrid (España). 303 pp.
- Cristinzio, G. (1978). Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia di Isernia. *Informatore Fitopatologico* 6, 21-23.
- Crous, P. W. y Gams, W. (2000). *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112-118.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. y Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55, 235-253.

- De Wet, J., Burguess, T., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2003). Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* 107, 557-566.
- De Wet, J., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A. y Wingfield, B. D. (2000). Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico and Indonesia. *Plant Disease* 84, 151-156.
- Denman, S., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Slippers, B., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2003). Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 95, 294-307.
- Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J. C., Pascoe, I. y Wingfield, M. J. (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.
- Di Marco, S., Mazzullo, A., Calzarano, F. y Cesari, A. (2000). The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 232-240.
- Eriksson, O. E. (1981). The families of bitunicate Ascomycetes. *Opera Botanica* 60, 1-220.
- Fallot, J., Deswarte, C., Dalmayrac, S., Colrat, S. y Roustan J. P. (1997). L'eutypiose de la vigne: isolement d'une molécule synthétisée par *Eutypa lata* et toxique pour la vigne. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie* 320, 149-158.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1, 315-324.
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (suppl.), S30-S42.
- Flaherty, D. L., Christensen, L. P., Lanini, W. T., Marois, J. J., Phillips, A. P. y Wilson, L. T. (1992). Grape Pest Management. Second Edition. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. California (EE.UU.). 400 pp.
- García, F., Torres, E., Martos, S., Calvet, C., Camprubí, A., Estaún, V. y Luque, J. (2005). Enfermedades de madera de la vid en Cataluña. *Viticultura/Enología Profesional* 99, 19-28.
- Gubler, W. D., Baumgartner, K., Browne, G. T., Eskalen, A., Latham, S. R., Petit, E. y Bayramian, L. A. (2004). Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33, 157-165.
- Halleen, F., Fourie, P. H. y Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (suppl.), S55-S67.
- Halleen, F., Fourie, P. H. y Crous, P. W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637-645.
- Jacobs, K. A. y Rehner, S. A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90, 601-610.
- Lardner, R., Mahoney, N., Zanker, T. P., Molyneux, R. J. y Scott, E. S. (2006). Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: analysis of the extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 107-114.
- Larignon, P. (2004). Réflexions sur l'esca. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 576, 28-31.
- Larignon, P. y Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147-157.
- Larignon, P. y Dubos, B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 184-189.
- Larignon, P. y Dubos, B. (2001). Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 538, 26-29.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. y Dubos, B. (2001a). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (suppl.), S336-S342.
- Larignon, P., Fulchic, R. y Dubos, B. (2001b). Un nouveau dépérissement de la vigne en France: le Black Dead Arm causé par *Botryosphaeria* spp. *IOBC/WPRS Bulletin* 24, 51-55.

- Lecomte, P., Leyo, M., Louvet, G., Corio-Costet, M. F., Gaudillère, J. P. y Blancard, D. (2005). Le Black Dead Arm, genèse des symptômes. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 587, 29-37.
- Lehoczky, J. (1974). Black dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9, 319-327.
- Linaldeddu, B. T., Franceschini, A., Luque, J. y Phillips, A. J. L. (2007). First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* 91, 324.
- Luque, J., Martos, S. y Phillips, A. J. L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111-1121.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J., Smith, L. R., Schoch, T. K., Rolshausen, P. E. y Gubler, W. D. (2005). Dying-arm disease in grapevines: Diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8148-8155.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2004). Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición. Coedición: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Mundi-Prensa. Madrid (España). 387 pp.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2005). Anuario de Estadística Agroalimentaria 2003. Madrid (España). 705 pp.
- Martelli, G. P. (1993). Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma (Italia). 263 pp.
- Martin, M. T. y Cobos, R. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46, 18-25.
- Mateo, J. y Yoller, J. (1994). Evolución de daños por eutipiosis en el viñedo de Rioja Alavesa. *Cuadernos de Fitopatología* 11, 18-20.
- Michailides, T. J. (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81, 566-573.
- Moller, W. J., Kasimatis, A. N. y Kissler, J. J. (1974). A dying arm disease of grape in California. *Plant Disease Reporter* 58, 869-871.
- Mugnai, L., Graniti, A. y Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404-418.
- Munkvold, G. P. y Marois, J. J. (1995). Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *Phytopathology* 85, 249-256.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) (2004). Situation et Statistiques du Secteur Vitivinicole Mondial. http://news.reseau-concept.net/pls/news/p_entree?i_sid=&i_type_edition_id=20869&i_section_id=&i_lang=33
- Padilla, V. (2004). Virosis. En: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición. Coedición: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Mundi-Prensa. Madrid (España). pp. 259-271.
- Paillassa, E., Dubos, B., Laignon, P. y Chevrier, J.C. (1992). L'inoculum infectieux d'*Eutypa lata*. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 440, 21-23.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Gryzenhout, M. y Wingfield, M. J. (2004). *Lasiodiplodia gonubensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50, 313-322.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A. y Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology* 56, 624-636.
- Pearson, R. C. y Goheen, A. C. (1990). Compendium of Grape Diseases. APS Press. Minesota (EE.UU.). 93 pp.
- Pennycook, S. R. y Samuels, G. J. (1985). *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24, 445-458.
- Péros, J. P. y Berger, G. (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*. *Plant Pathology* 14, 515-523.
- Phillips, A. J. L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327-332.

- Phillips, A. J. L. (2000). Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 341-356.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Phillips, A. J. L., Fonseca, F., Povoia, V., Castilho, R. y Nolasco, G. (2002). A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54, 59-77.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A y Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97, 513-529.
- Saccardo, P. A. (1877). Fungi veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi. *Michelia* 1, 1-72.
- Sánchez, M. E., Venegas, J., Romero, M. A., Phillips, A. J. L. y Traperó, A. (2003). *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87, 1515-1521.
- Savocchia, S., Steel, C. C., Stodart, B. J. y Somers, A. (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46, 27-32.
- Scheck, H. J., Vasques, S. J. y Gubler, W. D. (1998). First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease* 82, 590.
- Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W. y Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98, 1041-1052.
- Shoemaker, R. A. (1964). Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42, 1297-1303.
- Sivanesan, A. (1984). The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. J Cramer: Vaduz (Liechtenstein). 701 pp.
- Slippers, B. (2003). The taxonomy, phylogeny and ecology of Botryosphaeriaceous fungi occurring on various woody hosts. Tesis doctoral, Universidad de Pretoria, Pretoria, Sudáfrica.
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2004a). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83-101.
- Slippers, B., Fourie, P. H., Crous, P. W., Coutinho, Teresa A., Wingfield B. D., Carnegie A. J. y Wingfield M. J. (2004b). Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology* 50, 343-358.
- Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56, 128-139.
- Slippers, B., Summerell, B. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2005). Preliminary studies on *Botryosphaeria* species from Southern Hemisphere conifers in Australia and South Africa. *Australasian Plant Pathology* 34, 213-220.
- Slippers, B. y Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, 90-106.
- Smith, H., Wingfield, M. J., Crous, P. W. y Coutinho, T. A. (1996). *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* in *Pinus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62, 86-88.
- Sosnowski, M. R., Creaser, M. y Wicks, T. (2004). Managing eutypa dieback of grapevines by remedial surgery. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 488, 35-39.
- Surico, G., Mugnai, L. y Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (suppl.), S68-S86.
- Swart, L., Crous, P. W., Petrini, O., Taylor, J. E. (2000). Fungal endophytes of Proteaceae, with particular emphasis on *Botryosphaeria proteae*. *Mycoscience* 41, 123-127.
- Taylor, A., Hardy, G. E. St. J., Wood, P. y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187-195.

- Torrell, A. (2004). Podredumbres de la raíz (*Armillaria mellea* Vahl, *Rosellinia necatrix* Hartig). En: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición. Coedición: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Mundi-Prensa. Madrid (España). pp. 247-252.
- Trouba, K. J., Geisenhoffer, K. M. y Germolec, D. R. (2002). Sodium arsenite-induced stress-related gene expression in normal human epidermal, HaCaT, and HEL30 keratinocytes. *Environmental Health Perspectives* 110, 761-766.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. y Luque, J. (2007). First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91, 772.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D., Peláez, H., Santiago, Y. y Moreno, C. (2006a). The 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, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. y Gubler, W. D. (2006b). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490-1503.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Groenewald, J. Z. y Halleen, F. (2002). Botryosphaeria canker and dieback of grapevines. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers*.
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0902botryo.php3>
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald J. Z., Fourie, P. H. y Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.
- Van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F. y Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (suppl.), S43-S54.
- Von Arx, J. A. y Müller, E. (1954). Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. *Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11, 1-434.
- Waite, H. y May, P. (2005). The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 144-152.
- Waite, H. y Morton, L. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 5-17.
- Witcher, W. y Clayton, C. N. (1963). Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* (*B. ribis*). *Phytopathology* 42, 521-525.

SÍNTOMAS Y HONGOS ASOCIADOS A LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE LA VID EN PLANTA ADULTA EN CATALUÑA

1.1	INTRODUCCIÓN	28
1.2	MATERIAL Y MÉTODOS	29
1.3	RESULTADOS	31
1.3.1	Sintomatología de las enfermedades de madera	31
1.3.2	Hongos asociados a las lesiones de madera.....	36
1.4	DISCUSIÓN	39
1.5	BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

Entre 2003 y 2005 se llevó a cabo un muestreo en viñedos catalanes para caracterizar las enfermedades de madera presentes en vides adultas. En el estudio se estableció la relación entre los síntomas externos e internos de las plantas y la microflore asociada. Se observó que la concurrencia de daños internos de distintas enfermedades (yesca, eutipiosis y BDA [*black dead arm*]) en una misma planta es muy frecuente (44%), lo que dificulta el diagnóstico de las enfermedades. Los resultados también sugieren que la apoplejía parece afectar a plantas con gran cantidad de tejidos necróticos o alterados no funcionales, independientemente de que sean lesiones asociadas a la yesca. En estos muestreos se aislaron hasta nueve especies de hongos con una elevada frecuencia. Las más comunes fueron *Phaeoconiella chlamydospora*, asociada fundamentalmente a punteaduras necróticas y veteado pardo, *Fomitiporia mediterranea*, asociada a pudrición blanda y *Eutypa lata* asociada a necrosis sectorial. Distintas especies de Botryosphaeriaceae se encontraron, en una proporción también alta, asociadas principalmente a las necrosis sectoriales y centrales. Se identificaron un total de seis especies dentro de esta familia; de mayor a menor frecuencia: *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella viticola*, *Botryosphaeria dothidea*, *N. luteum* y *N. vitifusiforme*.

1.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, debido principalmente a la prohibición del arsenito sódico, se ha apreciado un aumento de la incidencia de las enfermedades de madera de la vid (Mugnai et al. 1999). Las enfermedades de planta adulta más conocidas son la yesca, la eutipiosis y el BDA (*black dead arm* o enfermedad del brazo muerto). De la yesca se reconoce una fase crónica, de evolución lenta, y una fase aguda o apoplejía, que causa la seca rápida de la planta (Mugnai et al. 1999). La expresión externa de los síntomas de la fase crónica se asocia a lesiones foliares características, con clorosis y necrosis internerviales. Internamente, se relaciona con lesiones como punteaduras necróticas, veteado pardo, necrosis irregulares y pudrición blanda (Mugnai et al. 1999). La pudrición se asocia principalmente a especies del género *Fomitiporia* y otros basidiomicetos (Fischer 2006), hongos secundarios ayudados por la acción de los patógenos vasculares primarios *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. (Larignon y Dubos 1997). La eutipiosis, causada por *Eutypa lata*, se caracteriza por un crecimiento reducido de los sarmientos y la presencia de hojas cloróticas. A nivel interno, se expresa como una necrosis en forma de V en cortes transversales de troncos y brazos afectados (Mateo y Yoller 1994; Chapuis et al. 1998). El BDA, relacionado con diversas especies de Botryosphaeriaceae, se asocia a una gran variedad de síntomas externos e internos, no específicos y ya descritos para otras patologías de madera (Van Niekerk et al. 2006). Según Larignon y Dubos (2001), la sintomatología externa puede ser confundida con la yesca. Sin embargo, otros autores relacionan el BDA con un crecimiento reducido y, en una fase avanzada, con la muerte del brazo, como ocurre en el caso de la eutipiosis (Castillo-Pando et al. 2001). A nivel interno, el BDA se relaciona habitualmente con la existencia de una necrosis en forma de V, tal como ocurre en la eutipiosis. En la práctica, la eutipiosis y el BDA presentan múltiples similitudes, de forma que ambas enfermedades sólo pueden diferenciarse con el aislamiento e identificación del agente causal (Castillo-Pando et al. 2001; Van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005).

A pesar de que la vitivinicultura es fundamental en la economía agraria española, el conocimiento a cerca del decaimiento de las vides y de los patógenos fúngicos asociados es más bien escaso en nuestro país. En la última década, se han llevado a cabo diversos estudios sobre la incidencia de estas patologías en España (Armengol et al. 2001a, Armengol et al. 2001b; Armengol et al. 2002; García et al. 2005; Aroca et al. 2006; Giménez-Jaime et al. 2006; Úrbez-Torres et al. 2006a). Este estudio pretende caracterizar las enfermedades de madera presentes en vid adulta en Cataluña, con el fin de establecer la relación existente entre los síntomas externos e internos de las distintas enfermedades y la micoflora asociada.

1.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Entre los años 2003 y 2005, se visitaron 79 viñedos en 59 fincas con síntomas de enfermedades de madera. Los puntos de muestreo visitados se encuentran en la región central catalana (D.O. Penedès y zonas vecinas), las D.O. tarraconenses Montsant, Priorat, Tarragona y Terra Alta, y la D.O. Empordà (Tabla 1.1). Las visitas fueron guiadas por técnicos del DAR (*Dep. Agricultura, Alimentació i Acció Rural*) de la Generalitat, que previamente habían realizado prospecciones del terreno para localizar los viñedos afectados. Los muestreos se llevaron a cabo en dos periodos del año: en primavera tardía (mayo y junio), cuando los síntomas de eutipiosis son más evidentes, y entre julio y agosto, época más apropiada para la detección de las plantas afectadas por yesca. Por periodos, se recogieron 97 muestras entre mayo y junio y

Tabla 1.1 Número de fincas y de muestras tomadas en los distintos periodos y zonas vitícolas prospectadas.

Zona vitícola	Fincas muestreadas	Plantas muestreadas	Restos de poda ^a	Periodos
D.O. Conca de Barberà	1	4	0	May-03
D.O. Empordà	5	19	3	May-Jun-05
D.O. Montsant	4	9	2	Jun-03, Jul-04
D.O. Penedès	27	88	9	May-Jun-Jul-Ago-03 y 04
D.O. Pla del Bages	1	3	0	Jul-04
D.O. Priorat	1	3	0	Jun-03
D.O. Tarragona	1	5	1	Jun-03
D.O. Terra Alta	14	41	9	Ago-03, Jun-Jul-04
Otras zonas no D.O.	5	20	2	Jun-03, Jun-Jul-04

^a Número de puntos en los que se recogieron restos de poda

95 durante julio y agosto. El número total de plantas muestreadas fue de 192, pertenecientes a 18 variedades de uva y 3 portainjertos diferentes. De cada planta muestreada se anotaron los síntomas externos en sarmientos y hojas. Las plantas con pocos brotes, sarmientos de escaso desarrollo, hojas pequeñas y cloróticas se diagnosticaron como afectadas por eutipiosis/BDA, debido a que estas dos patologías muestran unos síntomas externos e internos difíciles de diferenciar. Aquellas con hojas de normal desarrollo y lesiones internerviales bordeadas por una franja rojiza o amarillenta se clasificaron como afectadas de yesca. Se estableció una categoría diferente para las plantas afectadas de apoplejía (brotadas y posteriormente colapsadas). Se definió una cuarta categoría para las plantas que no fue posible clasificar en alguna de las patologías anteriores o que presentaban síntomas de varias de ellas, y que fueron catalogadas como dudosas.

A continuación se anotaron los síntomas internos de las plantas afectadas que presentaron lesiones en la madera como necrosis sectorial, necrosis central, punteaduras necróticas o veteado pardo y pudrición blanda (ver [Figura 1.4](#)). Se tomaron muestras de madera de las distintas partes afectadas, brazos y/o tronco, para llevar a cabo un examen más profundo en el laboratorio y realizar los aislamientos fúngicos. En el viñedo también se recogieron fragmentos de vid esparcidos por el suelo y procedentes de la poda, para la búsqueda de cuerpos fructíferos de los hongos. Las muestras, convenientemente identificadas, se almacenaron a 4^o C y fueron procesadas en las 72 horas siguientes a su recolección.

En el laboratorio se realizaron cortes longitudinales y transversales de los tejidos vegetales infectados y se recuperaron pequeños fragmentos de cada tipo de lesión. Los fragmentos se esterilizaron en superficie por inmersión en alcohol al 70%, durante 4 minutos, y, posteriormente, se dejaron unos segundos sobre papel de filtro para eliminar el exceso de alcohol. Tras ello, se sembraron en medio nutritivo PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) suplementado con sulfato de estreptomina (100 unidades/ml) (Johnston y Booth 1983). Las placas se mantuvieron a 25^o C, controlando a diario

el desarrollo de las colonias fúngicas hasta obtener cultivos puros de las especies de interés. Los restos de poda recuperados en campo se examinaron bajo la lupa para localizar los cuerpos fructíferos de los hongos relacionados con las patologías de la madera y, con ayuda de un microscopio óptico, se realizaron aislamientos monospóricos siguiendo la metodología de Johnston y Booth (1983). La identificación de las especies de Botryosphaeriaceae recuperadas se realizó combinando el estudio morfológico de los aislados con técnicas moleculares. El procedimiento seguido para la identificación de estos aislados se describe ampliamente en el capítulo 2. Los aislados fúngicos obtenidos entraron a formar parte de la colección de hongos del IRTA. Para ello, se le asignó un número de colección a cada uno de ellos y se prepararon dos tubos de agar inclinado con PDA y dos de agua estéril con fragmentos de micelio. Estos tubos se almacenaron en una cámara frigorífica a 4° C hasta su posterior uso.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Sintomatología de las enfermedades de madera

Los viñedos prospectados se distribuyen en un amplio rango de edades, correspondiendo el 75% de ellos a los niveles intermedios de edad, de 11 a 25 años (Figura 1.1a). El 63% de los viñedos muestreados estaban conducidos en emparrado y el 37% restante en vaso. En cuanto a las variedades muestreadas, se aprecia la importancia de la uva blanca en las zonas visitadas, con un 57% frente al 43% de tintas, debido al muestreo de importantes zonas productoras de cava (Penedès) (Figura 1.1b). Las variedades blancas principalmente muestreadas correspondieron, en orden decreciente, a Macabeo, Xarel·lo, Parellada y Chardonnay. Las variedades tintas estuvieron representadas principalmente por Tempranillo, Garnacha tinta, Cabernet-Sauvignon y Cariñena. Entre el resto de variedades de uva muestreadas aparecen Aledo, Chenin, Garnacha blanca, Don Mariano, Garnacha peluda, Merlot, Pinot Noir, Sauvignon blanco, Semillon y Syrah. Las variedades de portainjerto mayoritarias fueron R110 y 41B, de un total de 10 portainjertos muestreados, entre los que figuran 161-49C, 3309C, 420A, Fercal, P1103, R-Lot, Ru140 y SO4.

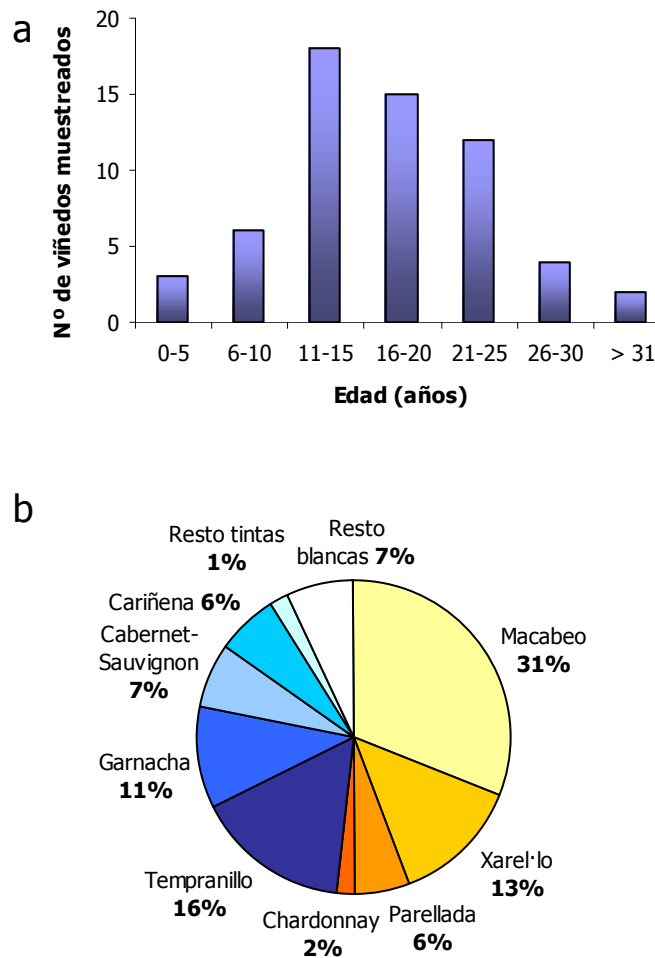


Figura 1.1 Distribución de los viñedos muestreados según el rango de edades **(a)** y el porcentaje de las variedades de uva muestreadas **(b)**.

En campo se detectaron tres sintomatologías diferentes relacionadas con el decaimiento de la vid: eutipiosis/BDA ([Figuras 1.2 a-b](#)), yesca ([Figuras 1.2 c-d](#)) y apoplejía ([Figura 1.2 e-f](#)). De acuerdo con los síntomas externos observados en campo, la patología detectada con mayor frecuencia fue la eutipiosis/BDA, con un 58% de incidencia media. Esta enfermedad se observó con mayor frecuencia durante los meses de mayo-junio (85%), afectando por igual a variedades tintas y blancas ([Figura 1.3 a-b](#)). La yesca se detectó preferentemente en el segundo periodo (julio-agosto), con una incidencia del 19% ([Figura 1.3a](#)). La yesca y la apoplejía resultaron estar menos extendidas que la eutipiosis/BDA, aunque fueron ligeramente más abundantes en las variedades blancas ([Figura 1.3b](#)). El resto de observaciones se dividieron en plantas no relacionadas con una patología concreta (1%),

plantas muertas (5%) y plantas que combinaron tanto síntomas de eutipiosis como de yesca en el mismo individuo (3%).



Figura 1.2 Síntomas característicos de la eutipiosis/BDA: crecimiento reducido con hojas pequeñas y cloróticas **(a)**, brazo izquierdo de la cepa con escasos sarmientos y hojas pequeñas y brazo derecho muerto **(b)**. Síntomas característicos de la yesca: necrosis foliares en variedad de uva tinta **(c)** y blanca **(d)**. Plantas afectadas por un fenómeno de apoplejía transcurridos 2 ó 3 días **(e)**, tras más de una semana **(f)**.

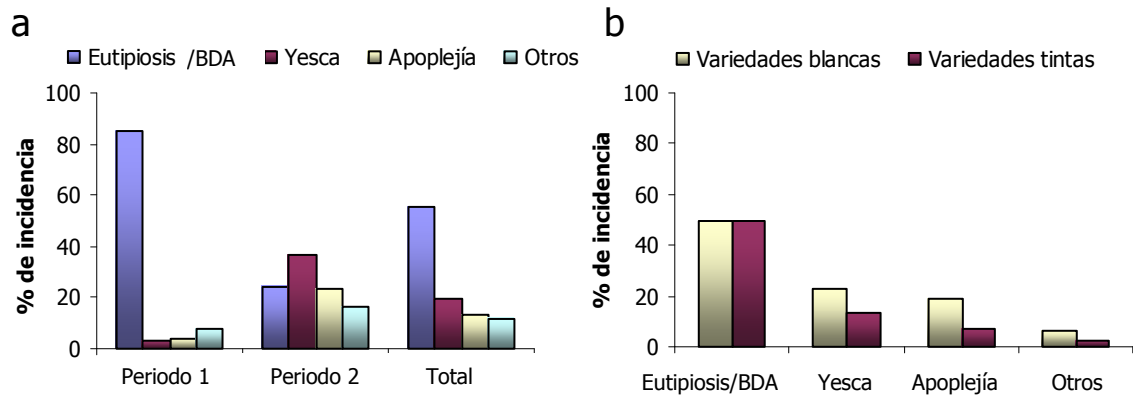


Figura 1.3 Porcentaje de incidencia de las enfermedades de madera según los periodos de muestreo (Periodo 1: mayo-junio, Periodo 2: julio-agosto y Total) **(a)** y sobre las distintas variedades de uva **(b)**. La categoría "Otros" agrupa a las plantas de sintomatología dudosa y a las plantas muertas.

En cuanto a los síntomas internos, se observaron cuatro tipos distintos de lesiones en la madera: necrosis sectorial, necrosis central, punteaduras necróticas en los vasos y pudrición blanda (Figura 1.4 a-d).

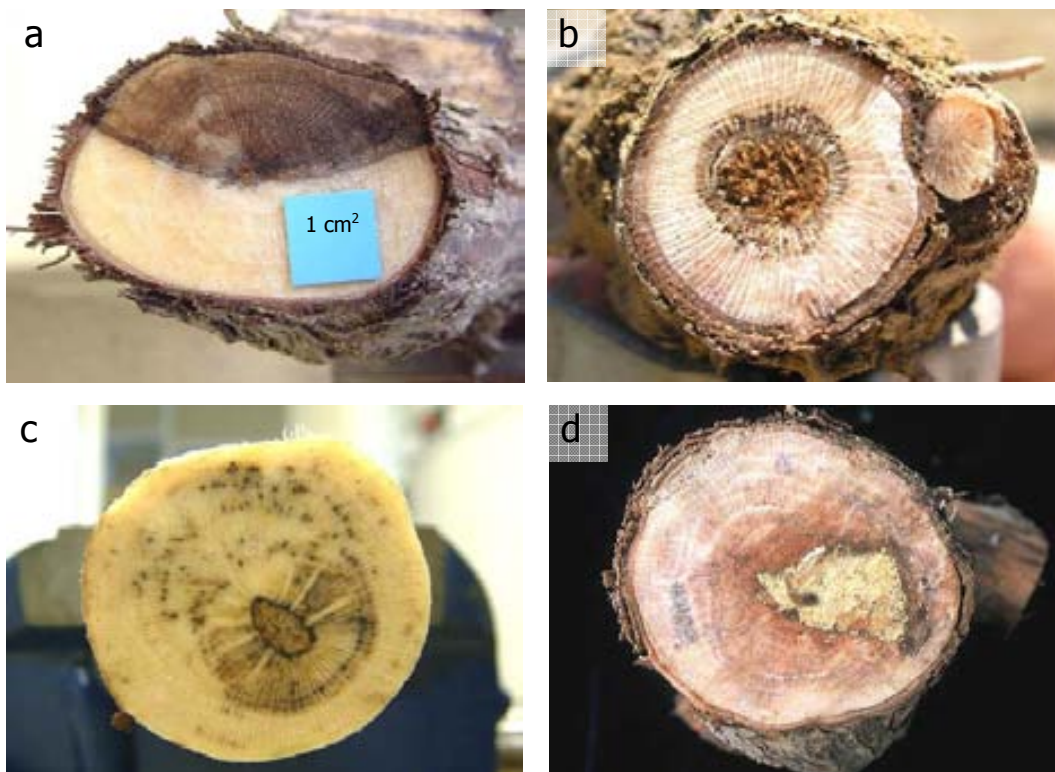


Figura 1.4 Distintos tipos de lesiones de la madera: necrosis sectorial **(a)**, necrosis central **(b)**, punteaduras **(c)** pudrición blanda **(d)**.

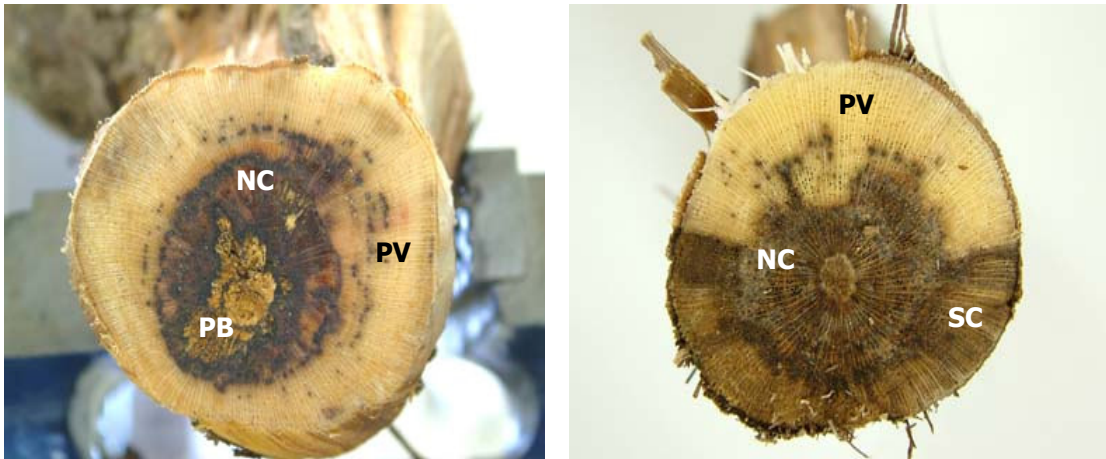


Figura 1.5 Ejemplos de la concomitancia de los síntomas internos. NC: necrosis central, PV: punteaduras, PB: pudrición blanda y SC: necrosis sectorial.

La principal característica en las vides muestreadas fue la coincidencia de varias lesiones internas en una misma planta (Figura 1.5). Un 44% de las plantas muestreadas ($n = 84$) mostraron síntomas internos relacionados potencialmente con las tres principales patologías de la viña, eutipiosis/BDA y yesca.




En la Tabla 1.2 se muestra la relación entre los síntomas externos e internos. Un 38% de las plantas catalogadas en campo como afectadas de eutipiosis/BDA presentaron, además de la necrosis sectorial típica de esta afección, algún tipo de lesión interna asociada a la yesca. En el caso de las plantas afectadas de yesca, un 47% presentó alguno de los tres síntomas internos de esta patología combinados con necrosis sectorial. Para las plantas apopléjicas, el porcentaje de síntomas concomitantes de eutipiosis/BDA y yesca se elevó al 62%. De las 26 plantas apopléjicas, cinco de ellas mostraron exclusivamente lesiones sectoriales, típicas de la eutipiosis/BDA, cuando, en la bibliografía, esta muerte súbita se relaciona con la yesca. En 24 plantas (13%), los síntomas internos no coincidieron con la diagnosis visual realizada en campo. Dos de estas plantas mostraron síntomas externos de yesca pero internamente sólo presentaron necrosis sectoriales, mientras que 17 plantas con crecimiento reducido y clorosis, asociables a eutipiosis/BDA, mostraron exclusivamente lesiones típicas de yesca en madera.

1 Resultados

Tabla 1.2 Porcentaje de las distintas lesiones internas en relación a la sintomatología externa diagnosticada en campo.

		Lesiones internas	
		SC ^a	PV ^b , NC ^c , PB ^d
Sintomatología externa	Eutipiosis/BDA (n= 111)	46	16
		38	
	Yesca (n = 37)	6	47
		47	
	Eutipiosis/BDA + Yesca (n = 5)	0	0
		100	
	Apoplejía (n = 26)	19	19
		62	
	Muertas o dudosas (n = 13)	15	46
		38	

^a Necrosis sectorial. ^b Punteaduras. ^c Necrosis central. ^d Pudrición blanda

	Porcentaje de plantas que presenta exclusivamente necrosis sectorial, asociada a eutipiosis y BDA
	Porcentaje de plantas con lesiones exclusivamente asociadas a yesca
	Porcentaje de plantas con lesiones de ambas patologías

El 45% de las plantas diagnosticadas como afectadas de eutipiosis/BDA mostraron al menos dos tipos diferentes de lesiones en madera ([Figura 1.6](#)). En los casos de yesca, eutipiosis/BDA+yesca y apoplejía, el porcentaje de plantas con dos o más lesiones distintas fue del 80%, 100% y 81%, respectivamente. En términos globales, el 63% de las plantas muestreadas mostraron al menos dos tipos diferentes de lesiones internas.

1.3.2 Hongos asociados a las lesiones de madera

A partir de las muestras de madera infectada que se recolectaron, se realizaron unos 1.450 aislamientos: 657 a partir de muestras con necrosis sectorial, 314 con punteaduras, 297 con otro tipo de necrosis y 187 con pudrición blanda. Aproximadamente, el 70% de los aislamientos dieron resultado positivo (al menos un hongo aislado) y se obtuvieron unos 500 aislados fúngicos. De estos aislados, 236 procedieron de necrosis sectorial, 104 de punteaduras, 97 de diferentes necrosis y 65 de madera podrida ([Tabla 1.3](#)). Los aislamientos a partir de brazos resultaron más frecuentes que los de tronco (78 frente a 22%). De los cuerpos fructíferos observados a la lupa, se obtuvieron 36 aislamientos positivos correspondientes a restos de poda (52%), brazo (36%) y tronco (11%).

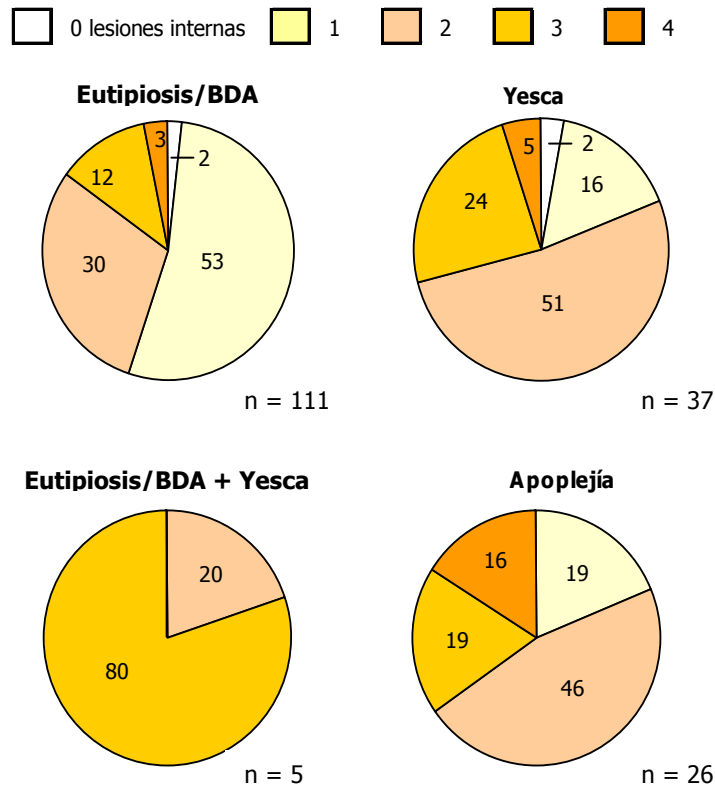


Figura 1.6 Porcentaje de plantas con un número de lesiones internas diferentes en relación a los cuatro categorías de síntomas externos que se diagnosticaron en campo.

Tabla 1.3 Porcentaje de aislamiento de especies fúngicas a partir de las diferentes lesiones internas y de los cuerpos fructíferos.

	Necrosis sectorial	Punteaduras	Necrosis central	Pudrición blanda	Cuerpos fructíferos
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0	< 1	1	0	6
<i>Diplodia seriata</i>	45	8	21	12	50
<i>Dothiorella viticola</i>	< 1	0	0	0	11
<i>Neofusicoccum parvum</i>	7	2	3	0	8
Otras Botryosphaeriaceae (<i>N. luteum</i> y <i>N. vitifusiforme</i>)	3	0	2	0	0
Total Botryosphaeriaceae	56	11	27	12	75
<i>Eutypa lata</i>	23	2	10	8	0
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1	< 1	5	54	0
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	1	4	12	< 2	0
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	6	73	25	12	0
Otras especies fúngicas	16	15	21	12	25

El desajuste en el sumatorio de los porcentajes se debe a la eliminación de los decimales

En cuanto a las especies aisladas de las diferentes lesiones, *Diplodia seriata* se recuperó a partir de todas las lesiones internas, siendo predominante su presencia en las zonas necróticas y, particularmente, en las necrosis sectoriales (45%) (Tabla 1.3). De las necrosis sectoriales también se aisló, en segundo término, *Eutypa lata* (23%), y el resto de taxones de Botryosphaeriaceae alcanzó, en conjunto, el 11%. *Phaeomoniella chlamydospora* fue predominante en las punteaduras vasculares y el veteado pardo, como indica el 73% de aislamiento, seguido con porcentajes muy inferiores por *Di. seriata* y *Phaeoacremonium aleophilum*. La necrosis central se asoció a una numerosa variedad de especies fúngicas, sin que destaque una especie predominante. Las especies aisladas con mayor frecuencia de este tipo de lesiones fueron *Pa. chlamydospora*, *Di. seriata*, *Pm. aleophilum*, y *E. lata*. De este tipo de necrosis se aislaron otros 10 taxones con frecuencias iguales o inferiores al 2%. La especie predominantemente aislada de la pudrición blanda fue *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. También se aislaron otros hongos de este tipo de lesión (como ejemplo, *Di. seriata*, *E. lata* y *Pa. chlamydospora*) aunque siempre con frecuencias inferiores al 13%.

El 75% de los cuerpos fructíferos examinados en la superficie de brazos, troncos y restos de poda correspondió a especies de Botryosphaeriaceae. *Diplodia seriata* fue la especie más abundante, con un 50% de las observaciones, seguida de *Dothiorella viticola* con un 11%. En una proporción menor se observaron *Neofusicoccum parvum* (8%) y *Botryosphaeria dothidea* (6%). De las otras especies aisladas, *Cryptovalsa ampelina* (Nitschke) Fuckel se detectó en el 17% de los casos y *Phomopsis viticola* en el 6%. En los cuerpos fructíferos analizados se hallaron fundamentalmente hongos en fase anamórfica, a excepción de *C. ampelina* y de los teleomorfos "*B.*" *parva* (Caldes de Montbui, Barcelona, sobre brazo) y "*B.*" *viticola* (Vimbodí, Tarragona, sobre restos de poda), ambos en una única ocasión.

Las especies de Botryosphaeriaceae supusieron el 41% de todos los aislados. De los 204 aislamientos positivos de esta familia se identificaron seis especies: *B. dothidea*,

Tabla 1.4 Porcentaje de aislamiento de especies de Botryosphaeriaceae en relación a la parte de la planta muestreada.

	Brazo	Tronco	Sarmiento	Total
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	< 2	< 3	0	2
<i>Diplodia seriata</i>	84	63	64	79
<i>Dothiorella viticola</i>	< 1	0	29	< 3
<i>Neofusicoccum luteum</i>	0	< 3	0	< 1
<i>Neofusicoccum parvum</i>	12	29	7	15
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	0	< 3	0	< 1
Otras Botryosphaeriaceae	1	0	0	1

El desajuste en el sumatorio de los porcentajes se debe a la eliminación de los decimales

Di. seriata, *Do. viticola*, *N. luteum*, *N. parvum*, y *N. vitifusiforme*. *Diplodia seriata* fue la especie mayoritaria (79%), seguida de *N. parvum* (15%), mientras el resto de especies se aislaron, en cada caso, en una proporción inferior al 3% (Tabla 1.4). En cuanto a la zona de la planta analizada, *Di. seriata* se recuperó en una proporción alta en tronco, brazo y sarmiento. *Neofusicoccum parvum* se aisló preferentemente de tronco, mientras que *Do. viticola* se encontró principalmente en sarmiento, concretamente en restos de poda.

1.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de las tres principales enfermedades de madera de la vid en Cataluña: yesca, eutipiosis y BDA.

Según Larignon y Dubos (2001), el BDA muestra síntomas foliares similares a la yesca aunque otros autores han expresado sus dificultades para distinguirlo de la eutipiosis (Castillo-Pando et al. 2001; Van Niekerk et al. 2004; Úrbez-Torres et al. 2006b). Las plantas afectadas por eutipiosis suelen presentar brazos con un número escaso de sarmientos, que tiende a reducirse año tras año para acabar con la muerte total del brazo (Moller y Kasimatis 1981). La enfermedad del BDA provoca igualmente un crecimiento reducido y la muerte del brazo en un plazo más o menos largo de tiempo (Castillo-Pando et al. 2001). A nivel interno, uno de los síntomas descritos para el BDA, es la necrosis sectorial en forma de V, que también es compartido por la eutipiosis. La similitud de síntomas entre eutipiosis y BDA y la ausencia

de las necrosis foliares del BDA apuntadas por Larignon y Dubos (2001) en las plantas muestreadas no ha permitido definir categorías exclusivas para estas patologías. A pesar de que la sintomatología externa e interna no muestra síntomas diferenciadores entre eutipiosis y BDA, la mejor evidencia de la existencia de BDA en los viñedos catalanes es la alta frecuencia con que se aísla uno de sus agentes causales, *Di. seriata*. Dadas las similitudes entre ambas patologías, sería necesario investigar más a fondo la expresión de los síntomas de ambas patologías en plantas afectadas.

La división de los muestreos en dos periodos resultó adecuada para la detección externa de los dos principales conjuntos de síntomas, eutipiosis/BDA y yesca. La eutipiosis o el BDA fueron detectados de forma más frecuente en mayo y junio, mientras que la yesca lo fue en los meses de julio y agosto. El tipo de muestreo realizado, al ser dirigido y no planeado al azar, no nos permite establecer cuál es la incidencia real de las distintas enfermedades en Cataluña. Sin embargo, parecería que las patologías asociadas a la muerte de brazos son las más abundantes en las zonas visitadas.

Durante el verano se observó un aumento considerable de las muertes por apoplejía. Estos episodios de apoplejía o colapso ocurren principalmente durante los meses centrales del verano, cuando la planta demanda una mayor cantidad de agua (García et al. 2005). En la bibliografía, este fenómeno se asocia principalmente al mal de la yesca en su evolución rápida o fase aguda (Mugnai et al. 1999; Surico et al. 2006). En nuestro estudio, las plantas apopléjicas mostraron, en sección transversal de brazos y troncos, un porcentaje muy elevado de tejidos muertos o no funcionales. Además, estas plantas presentaron frecuentemente necrosis sectoriales que se asocian a otras patologías, como la eutipiosis y el BDA. Este dato parece indicar que la seca rápida de una vid no es un síntoma específico de la yesca, sino la consecuencia de tener, en periodos de gran demanda hídrica, parte de los tejidos conductores atrofiados, sea cual sea la patología que lo cause. Para resolver esta cuestión sería

preciso llevar a cabo nuevas investigaciones que aclaren cómo se relacionan el porcentaje de madera no funcional y el estrés hídrico con la apoplejía.

La concomitancia de varios síntomas internos en una misma planta ya fue citada por Mugnai et al. (1999). Estos autores observaron que plantas afectadas de yesca podían presentar distintas lesiones en la madera que eran visibles conjuntamente o que se sucedían en el tiempo unas a otras. En primer lugar aparecen unas punteaduras oscuras que tienden a confluir dando lugar a una necrosis central. Finalmente la madera pierde su consistencia dura y se degrada en una masa blanda de tonos amarillentos, lo que comúnmente se conoce como pudrición blanda (Mugnai et al. 1999). Por tanto, la yesca agruparía tres de las cuatro lesiones observadas en la madera. El cuarto tipo de lesión, la necrosis sectorial, se asocia en la bibliografía tanto a la eutipiosis (Chapuis et al. 1998) como a la enfermedad de la muerte del brazo (Van Niekerk et al. 2002), lo que se resuelve tan sólo con el aislamiento del agente causal.

En nuestro muestreo, el alto porcentaje de plantas que combinaron la presencia de una necrosis sectorial con el resto de lesiones típicas de yesca indica que, con frecuencia, las distintas enfermedades pueden ocurrir de forma concomitante sobre una misma planta. Por tanto, a nivel general, no se puede asociar exclusivamente un tipo de lesión interna con una única enfermedad. La concurrencia de yesca y eutipiosis ya se ha mencionado con anterioridad (Minervini y Bisiach 1995; Mugnai et al. 1999), aunque en ninguno de los trabajos consultados se citan datos cuantitativos. La presencia de varias enfermedades en una misma planta puede deberse a diversos eventos infectivos a través de las heridas de poda y otras heridas causadas a la planta durante el cultivo. Muchos de los patógenos relacionados con el decaimiento de vides tienen una dispersión aérea y su vía habitual de entrada en la planta son las heridas producidas en la poda (Carter 1988; Mugnai et al. 1999; Surico et al. 2006; Van Niekerk et al. 2006).

Los aislamientos fúngicos a partir de la madera infectada indican una cierta relación entre el tipo de lesión y el hongo aislado. Así por ejemplo, *Di. seriata* y *E. lata* se obtienen principalmente de las necrosis en forma de V. En la bibliografía se menciona que los daños producidos internamente por ambos hongos son visualmente indistinguibles (Gubler et al. 2005). El hongo más abundante en nuestras lesiones fue *Di. seriata*, aproximadamente el doble de frecuente que *E. lata*. En ocasiones, ambas especies se aislaron de una misma sección. A la luz de estos resultados, parece que la enfermedad del BDA es mucho más abundante que la eutipiosis en Cataluña. En Francia, Larignon y Dubos (1997) aislaron más frecuentemente *E. lata* a partir de las necrosis sectoriales que cualquier otra especie de Botryosphaeriaceae. Sin embargo, Armengol et al. (2001a) confirmaron la mayor incidencia de *Di. seriata* en relación a *E. lata* en viñedos españoles. Esto parece sugerir que *E. lata* es probablemente menos abundante en los países de clima mediterráneo y más en las regiones frías y lluviosas. Este patógeno parece necesitar lluvias que superen los 350 mm para su dispersión (Carter 1991; Mugnai et al. 1999), lo que podría explicar su menor incidencia en lugares de clima mediterráneo.

Phaeomoniella chlamydospora se aísla de las punteaduras necróticas y el veteado pardo como hongo mayoritario (73%). Según la bibliografía, estas punteaduras oscuras, que pueden aparecer en plantas afectadas de yesca, se relacionan con la actividad de los hongos *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora* (Bertelli et al. 1998). Sin embargo, en nuestro caso el aislamiento de *Pm. aleophilum* de este tipo de lesiones fue prácticamente residual.

Fomitiporia mediterranea se confirma como el causante de la madera podrida. Los primeros estudios sobre la etiología de la yesca que datan de principios del siglo XX, identificaron a *Phellinus igniarius* (L.:Fr.) Quélet y *Stereum hirsutum* como los agentes causales de esta enfermedad (Chiarappa 1959). En trabajos posteriores en Italia y Francia, se asoció la típica pudrición blanda de la yesca casi exclusivamente a *P. igniarius* ya que el aislamiento de *S. hirsutum* era muy infrecuente (Larignon y Dubos 1997). Cortesi et al. (2000) aislaron

Fomitiporia punctata en un 50% de vides afectadas de yesca en Italia y en ningún caso *P. igniarius*. Según estos autores, es posible que la identificación del hongo se realizase de forma incorrecta ya que estas especies son parecidas, diferenciándose en la morfología de los cuerpos fructíferos, que además son poco abundantes (Cortesi et al. 2000). Fischer (2002), apoyándose en estudios moleculares, describió una nueva especie específica de vid que denominó *F. mediterranea*, relegando *F. punctata* a otros huéspedes distintos de *Vitis*. Nuestros resultados confirman los datos anteriores, ya que *S. hirsutum* sólo se recuperó en una ocasión, mientras que *F. mediterranea* se aisló de la madera podrida en un 52% de los casos.

A partir de las necrosis centrales no se aisló una especie mayoritaria sino numerosas especies, como *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*. Se cree que este tipo de necrosis se generan por la confluencia de las punteaduras (Mugnai et al. 1999) aunque, en la bibliografía, no se asocia específicamente esta lesión con un hongo concreto (Mugnai et al. 1996; Larignon y Dubos 1997; Mugnai et al. 1999; Serra 1999). Nuestros resultados parecen confirmar este dato, por lo que las necrosis centrales parecen un signo inespecífico de distintas afecciones.

Las especies de Botryosphaeriaceae se asocian al BDA en Francia (Larignon et al. 2001) y al decaimiento de vides en Australia (Castillo-Pando et al. 2001) y Sudáfrica (Van Niekerk et al. 2002). Se han identificado cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae en Portugal (Phillips 2002), nueve en la República de Sudáfrica (Van Niekerk et al. 2004) y nueve también en California (Úrbez-Torres et al. 2006b; Úrbez-Torres et al. 2007). En el presente estudio, se aislaron especies de Botryosphaeriaceae de todas las lesiones catalogadas, aunque se obtuvieron principalmente de las necrosis sectoriales, seguidas de las centrales. La especie más frecuente fue *Di. seriata*, seguida de *N. parvum*. Armengol et al. (2001b) también aislaron *Di. seriata* en un alto porcentaje de las muestras, un 72%, asociándose también a necrosis sectorial. De las seis especies identificadas en nuestro muestreo, *B. dothidea*, *Di. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum* coincidieron con cuatro de las cinco especies de Botryosphaeriaceae aisladas en Portugal. La quinta especie portuguesa, que no llegó a ser detectada en Cataluña,

fue *Diplodia mutila*. Otra de las especies halladas en Cataluña fue *Do. viticola*, descrita por primera vez como especie nueva para la ciencia por Luque et al. (2005). Esta especie se encuentra presente también en Sudáfrica, aunque identificada previamente como *Diplodia* sp. (Van Niekerk et al. 2004), y en California (Úrbez-Torres et al. 2007). *Neofusicoccum vitifusiforme*, descrita por primera vez en Sudáfrica por Van Niekerk et al. (2004), se aisló tan sólo una vez en nuestro muestreo. En las cuatro zonas consideradas, California, Portugal, Sudáfrica y Cataluña, aparecen *N. luteum*, *Di. seriata* y *N. parvum* como especies coincidentes. *Diplodia seriata* destaca por ser la especie predominante en todas ellas salvo en Portugal, cuya especie más común es *N. parvum* (Phillips 2002). También se ha confirmado la predominancia de *Di. seriata* en viñedos franceses (Larignon y Dubos 2001). En Italia, algunos autores destacan que la presencia de Botryosphaeriaceae es reducida (Mugnai et al. 1996; Serra 1999), sin embargo, otros reconocen que se aísla a menudo de cepas afectadas de yesca (Minervini y Bisiach 1988; Di Marco y Draghetti 1992). Hasta el momento, existen especies de Botryosphaeriaceae que sólo se han aislado en el hemisferio norte (*B. dothidea* y *Di. mutila*) y otras exclusivamente en el hemisferio sur (*Neofusicoccum viticlavatum* y *Diplodia porosum*). Se consideraba que *N. australe* y *N. vitifusiforme* también eran exclusivas del hemisferio sur, sin embargo, la primera se ha hallado recientemente en California (Úrbez-Torres et al. 2006b) y la segunda en nuestro muestreo. Debido al creciente impacto de las especies de Botryosphaeriaceae como patógenos de vid, es necesario seguir muestreando zonas vitícolas para definir, con mayor precisión, el mapa de distribución de todas ellas.

Las fructificaciones de Botryosphaeriaceae se hallaron siempre en tejidos muertos del huésped ya sea, sobre troncos o brazos afectados o sobre sarmientos procedentes de podas anteriores y repartidos por el suelo del viñedo. La especie aislada de forma mayoritaria fue *Di. seriata*, que resulta especialmente abundante en los restos de poda. Debido a que esta especie esta asociada de forma importante con lesiones internas en la planta, los fragmentos de madera le servirían como refugio, representando una fuente de inóculo importante para nuevas infecciones. La retirada de los fragmentos de poda ya ha sido recomendada

anteriormente como una buena práctica cultural para evitar esta fuente de inóculo (Larignon y Dubos 2001).

Los resultados de este estudio permiten concluir que la concomitancia de síntomas internos de varias enfermedades de madera sobre una misma planta es frecuente en Cataluña e impide asociar de forma unívoca un síntoma interno con determinados síntomas externos. Sin embargo sí se puede asociar, de forma general, la aparición de un síntoma interno con la actividad de un hongo concreto. Esto pone de manifiesto la dificultad de diagnosticar estas enfermedades en campo si sólo se consideran los síntomas externos. A la luz de estos resultados, el BDA, relacionado con diversas especies de la familia Botryosphaeriaceae, resultó ser la enfermedad de madera de la viña más abundante en Cataluña.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Armengol, J., Vicent, A. y García-Jiménez, J. (2002). El decaimiento y muerte de vides jóvenes (enfermedad de Petri) en España. *Phytoma España* 138, 91-93.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. y García-Jiménez, J. (2001a). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: A three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S325-S329.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. y García-Jiménez, J. (2001b). Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 27, 137-153.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. y Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115, 195-202.
- Bertelli, E., Mugnai, L. y Surico, G. (1998). Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 37, 79-82.
- Carter, M. V. (1991). The status of *Eutypa lata* as a pathogen. *Phytopathological Papers no. 32*. CAB International, Oxon, (Gran Bretaña). 70 pp.
- Carter, M. V. (1988). *Eutypa dieback*. In: R. C. Pearson & A. C. Goheen (Eds.), *Compendium of grape diseases*. APS Press. Minesota (EE.UU.). pp. 32-33.
- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M. y Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30, 59-63.
- Chapuis, L., Richard, L. y Dubos, B. (1998). Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology* 47, 463-472.
- Chiarappa, L. (1959). Wood decay of grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology* 49, 510-519.
- Cortesi, P., Fischer, M. y Milgroom, G. (2000). Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of Esca. *Phytopathology* 90, 967-972.
- Di Marco, S. y Draghetti, L. (1992). Ulteriori acquisizioni sull'attività di fungicidi triazolici contro il mal dell'esca della vite. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 221-228.

- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1, 315-324.
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (suppl.), S30-S42.
- García, F., Torres, E., Martos, S., Calvet, C., Camprubí, A., Estaún, V. y Luque, J. (2005). Enfermedades de madera de la vid en Cataluña. *Viticultura/Enología Profesional* 99, 19-28.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2006). Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154, 598-602.
- Gubler, W. D., Rolshausen, P. E., Trouillase F. P., Urbez, J. R., Voegel, T., Leavitt, G. M. y Weber, E. A. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery & Vineyard*.
<http://www.practicalwinery.com/janfeb05/janfeb05p6.htm>
- Johnston, A. y Booth, C., Eds. (1983). Plant pathologist's pocketbook. Second edition. Commonwealth Agricultural Bureaux. Slough (Gran Bretaña). 439 pp.
- Larignon, P. y Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147-157.
- Larignon, P. y Dubos, B. (2001). Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 538, 26-29.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. y Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S336-S342.
- Luque, J., Martos, S. y Phillips, A. J. L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp nov on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111-1121.
- Mateo, J. y Yoller, J. (1994). Evolución de daños por eutipiosis en el viñedo de Rioja Alavesa. *Cuadernos de Fitopatología* 11, 18-20.
- Minervini, G. y Bisiach, M. (1995). Presenza di eutipiosi ed esca nei vigneti del Veneto e della Lombardia. *Vignevini Ricerca* 4, S19-S25.
- Minervini, G., y Bisiach, M. (1988). Il deperimento della vite. Sintomatologia e indagine sui complessi fungini associati. *Notiziario sulle Malattie delle Piante* 109, 19-27.
- Moller, W. J. y Kasimatis, A. N. (1981). Further evidence that *Eutypa armeniaca* -not *Phomopsis viticola*- incites dead arm symptoms on grape. *Plant Disease* 65, 429-431.
- Mugnai, L., Graniti, A. y Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404-418.
- Mugnai, L., Surico, G. y Esposito, A. (1996). Micoflora associata al mal dell'esca della vite in Toscana. *Informatore Fitopatologico* 46, 49-55.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Serra, S. (1999). Relazione tra sintomatologia fogliare, alterazioni e micoflora del legno in viti affette da mal dell'esca ed eutipiosi. *Informatore Fitopatologico* 49, 30-34.
- Surico, G., Mugnai, L. y Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S68-S86.
- Taylor, A., Hardy, G. E. St. J., Wood, P. y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187-195.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Groenewald J. Z. y Halleen, F. (2002). *Botryosphaeria* canker and dieback of grapevines. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers*.
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0902botryo.php3>
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W. Groenewald J. Z., Fourie, P. H. y Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.

- Van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F. y Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S43-S54.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. y Luque, J. (2007). First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91, 772.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D., Peláez, H., Santiago, Y., Martín, C. y Moreno, C. (2006a). Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y Leon region, Spain. *Plant Disease* 90, 835.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. y Gubler, W. D. (2006b). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490-1503.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE PRESENTES EN VID

2.1	INTRODUCCIÓN	49
2.2	MATERIAL Y MÉTODOS	50
2.2.1	Estudio morfológico.....	51
2.2.2	Estudio molecular de las regiones ITS, EF y β -tubulina	53
2.2.3	Análisis filogenético de especies de Botryosphaeriaceae.....	56
2.2.4	Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante amplificación cooperativa, hibridación <i>dot blot</i> y revelado colorimétrico.....	57
2.3	RESULTADOS	62
2.3.1	Identificación y caracterización morfológica de especies de Botryosphaeriaceae.....	62
2.3.2	Identificación y caracterización molecular y filogenia de especies de Botryosphaeriaceae.....	68
2.3.3	Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante amplificación cooperativa, hibridación <i>dot blot</i> y revelado colorimétrico.....	74
2.4	DISCUSIÓN	78
2.4.1	Identificación de Botryosphaeriaceae.....	78
2.4.2	Nueva técnica de detección específica para Botryosphaeriaceae.....	82
2.5	BIBLIOGRAFÍA	85

RESUMEN

En este capítulo se ha trabajado en la identificación, tanto a nivel morfológico como molecular, de siete especies de Botryosphaeriaceae aisladas en vid (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *Di. seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme* y *Dothiorella viticola*). Cinco especies pudieron ser identificadas claramente en base a la morfología y tamaño de los conidios, aunque las diferencias morfológicas entre *B. dothidea* y *N. vitifusiforme* fueron muy sutiles y no permitieron separar ambas especies. La identificación basada en métodos moleculares ayudó a resolver la ambigüedad entre estas dos especies y confirmó el resto de identificaciones. La filogenia de Botryosphaeriaceae se realizó en base a las regiones moleculares ITS, EF 1- α y β -tubulina, aunque para su combinación fue necesario dividir los aislados en dos grupos, *Diplodia*/*Lasiodiplodia* y *Fusicoccum*/*Neofusicoccum*/*Dothiorella*. La identificación realizada coincidió con otros estudios previos, confirmando así la adecuada combinación de la información morfológica y molecular. Por último, y con el propósito de conseguir un método de detección rutinario para el conjunto de las especies de Botryosphaeriaceae de vid, se aplicó la técnica de la PCR cooperativa (Co-PCR) y el revelado colorimétrico con una sonda específica diseñada por nuestro equipo (*Boñ*). La sonda consiguió identificar de forma inequívoca al grupo de siete especies de Botryosphaeriaceae de vid. La técnica destacó por su alta sensibilidad y facilidad interpretativa.

2.1 INTRODUCCIÓN

Durante décadas, la identificación de las especies de la familia Botryosphaeriaceae se ha realizado en base a los caracteres morfológicos del anamorfo, debido a la escasez de teleomorfos en la naturaleza (Shoemaker 1964), a la similitud de éstos últimos entre especies (Denman et al. 2000) y a la imposibilidad de obtenerlos en cultivo (Laundon 1973). Sin embargo, algunas de las características de los anamorfos presentan cierta plasticidad (Laundon 1973; Butin 1993) y pueden mostrar cierto grado de solapamiento entre especies (Slippers et al. 2004b), dificultando así su identificación. En ocasiones, se utilizan caracteres de las colonias, tales como la morfología y la tasa de crecimiento micelial a diferentes temperaturas (Pennycook y Samuels 1985; De Wet et al. 2003), aunque estos caracteres son válidos para especies muy concretas y no se pueden aplicar de forma general. En consecuencia, la identificación basada en caracteres morfológicos supone un proceso bastante lento y no siempre exitoso, por lo que, en los últimos años, se ha recurrido a distintas técnicas moleculares para el estudio de la taxonomía de estas especies (Slippers 2004b; Van Niekerk et al. 2004; Alves et al. 2005; Phillips et al. 2005). Los espaciadores internos de transcripción (ITS) del operón nuclear del ADN ribosómico han sido aplicados con éxito en la identificación de clados grandes de Botryosphaeriaceae (Denman et al. 2000; Slippers et al. 2004b; Phillips et al. 2005). Para taxones estrechamente relacionados, sin embargo, es necesario combinar la información de las regiones ITS, el factor de elongación 1- α (EF 1- α) y la β -tubulina (Slippers et al. 2004b). Las filogenias más recientes de Botryosphaeriaceae se basan en cladogramas de una o más secuencias de datos moleculares, sustentadas siempre por los caracteres morfológicos (Van Niekerk et al. 2004; Phillips et al. 2005).

El avance de las técnicas moleculares en los últimos años ha permitido el desarrollo de métodos más efectivos para la detección de los patógenos, a menudo basados en la técnica convencional de la PCR. Un ejemplo de ello es la amplificación mediante PCR cooperativa (Co-PCR), técnica que, en una única reacción y mediante la acción combinada de tres o más iniciadores, alcanza la sensibilidad de la PCR anidada y reduce así el riesgo de contaminación

(Olmos et al. 2002; Caruso et al. 2003). En los primeros ciclos de la reacción Co-PCR se producen tres o más amplicones mediante la combinación aleatoria de los iniciadores y, en las fases subsiguientes, los propios amplicones de pequeño y mediano tamaño sirven de cebadores para generar el fragmento mayor (Olmos et al. 2002; Caruso et al. 2003). Posteriormente, la detección de los amplicones mediante sondas de hibridación específicas y marcadas, y el posterior revelado colorimétrico de los productos, también permite aumentar la sensibilidad de la detección en relación a los geles de agarosa convencionales, lo que facilita su aplicación en los procesos rutinarios de detección (Olmos et al. 2002). Estas técnicas combinadas ya han sido aplicadas con éxito en la identificación de bacterias, virus y fitoplasmas (Olmos et al. 2002; Caruso et al. 2003; Bertolini et al. 2007) y ofrecen la posibilidad de ser empleadas con otros patógenos vegetales, como por ejemplo los hongos.

En este capítulo se exponen los pasos seguidos para la identificación de especies de la familia Botryosphaeriaceae asociadas a la vid. En el proceso de identificación se combinaron las herramientas clásicas, como el estudio morfológico de las estructuras reproductoras y la tipología de las colonias, con las moleculares, a partir del análisis de las regiones ITS, EF1- α y β -tubulina. La información extraída de los datos moleculares permitió reconstruir la filogenia de las especies estudiadas y validar los caracteres morfológicos empleados. Por último, se trabajó en la identificación de las especies de la familia Botryosphaeriaceae con la aplicación de la Co-PCR y de la hibridación *dot blot*. Esta nueva técnica desarrollada en este trabajo ha permitido a poner a punto un método de detección rápido, de bajo coste y gran sensibilidad para las especies de Botryosphaeriaceae presentes en vid.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Estudio morfológico

a) *Estructuras reproductoras*

La identificación morfológica de las especies de Botryosphaeriaceae se basó principalmente en el estudio de las estructuras reproductivas de los anamorfos, en concreto,

del tipo de conidiogénesis y de los conidios. Se realizó un estudio exhaustivo de 16 aislados de las siete especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vid (Tabla Anexo 2). Los aislados seleccionados proceden de la Península Ibérica, principalmente de nuestros muestreos de campo, más cuatro aislados portugueses cedidos por el Dr. Alan Phillips (Univ. Nova de Lisboa, Portugal) y un aislado de *Diplodia mutila* cedido por el Dr. J. Legorburu (NEIKER, País Vasco). El desarrollo de los cuerpos fructíferos se consiguió colocando una fracción de una colonia en crecimiento activo en una placa Petri con medio agar-agua y con fragmentos de sarmiento de vid previamente autoclavados. Las placas se incubaron a 25° C y se sometieron a un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, manteniendo este fotoperiodo durante aproximadamente un mes, hasta observar la producción de picnidios sobre los fragmentos vegetales. Transcurrido este tiempo, se realizaron preparaciones microscópicas para la observación de la conidiogénesis y la medición de los conidios. Se midió la longitud y anchura de 50 conidios por aislado, que sirvió para calcular la ratio longitud/anchura, y se estudió su morfología mediante fotografías realizadas con un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

b) *Tipología y crecimiento de las colonias*

Para el estudio morfológico de las colonias y de su crecimiento en placa se emplearon 15 aislados, pertenecientes a siete especies (Tabla Anexo 2). Las placas se prepararon disponiendo en el centro fragmentos de 5 mm de diámetro que se obtuvieron del margen de una colonia con una edad máxima de 7 días. Para el estudio de la tipología, se sembraron cuatro placas de PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) para cada uno de los 15 aislados analizados y se incubaron a 25° C, repitiendo el ensayo una segunda vez. Se siguió el desarrollo de los aislados diariamente, durante 7 días, y se anotaron las características de las colonias. Los caracteres más destacados que se observaron fueron la cantidad y color del micelio formado, el color del reverso de la colonia y la producción de pigmentos en el medio. Las observaciones de la coloración superior e inferior del micelio se realizaron entre los 2 y 4 días posteriores a la siembra de la placa.

Para el estudio del crecimiento de las colonias fúngicas, los aislados se incubaron en tres medios de cultivo diferentes y en un rango de temperatura de 5° C a 35° C, con intervalos de 5° C. Se realizaron cuatro réplicas por aislado, medio y temperatura, repitiendo el experimento una segunda vez. Los sustratos empleados fueron medios comerciales: PDA, CMA (*Corn Meal Agar*) y MEA (*Malt Extract Agar*) al 2% (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.). Las placas se marcaron por el reverso con dos diámetros formando ángulo recto y, una vez sembradas, se incubaron en estufa en el rango de temperaturas indicado anteriormente. Transcurridos dos días de la siembra, se tomó medida del crecimiento, desde el centro de la placa hasta el punto de desarrollo del micelio, utilizando como referencia cada uno de los cuatro radios marcados en el reverso.

2.2.2 Estudio molecular de las regiones ITS, EF y β -tubulina

a) *Aislados fúngicos*

En el estudio molecular de las especies de Botryosphaeriaceae se emplearon 20 aislados, procedentes de los muestreos de viñedos realizados por nuestro equipo (Tabla Anexo 2). Para la reconstrucción filogenética también se recopilaron secuencias de GenBank (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>), lo que permitió ampliar el número de aislados estudiados y disponer de una mayor variabilidad genética. Con el propósito de aumentar la diversidad genética del estudio, se trabajó tanto con aislados obtenidos de vid como de otros hospedadores. Una vez recopilada toda la información, se construyó la filogenia del grupo con las secuencias de 40 aislados de 11 especies diferentes. (Tabla Anexo 2; Tabla Anexo 3).

b) *Extracción de ADN a partir de micelio*

El crecimiento de los aislados se llevó a cabo en medio de cultivo PDA durante un máximo de 7 días a 25° C. El ADN genómico se extrajo de micelio fresco siguiendo una adaptación del método de Martin et al. (1998), según se describe a continuación. Se recogió la parte aérea de la colonia (entre 20 y 30 mg) y se almacenó a -20° C en tubos Eppendorf de 1,5

ml. En el momento de realizar la extracción se añadieron 600 μ l de tampón de lisis (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 1400 mM, EDTA 20 mM) a cada muestra y se trituró con ayuda de un micropistilo. La mezcla se calentó al baño María a 65° C, durante 40-60 min, para después centrifugarla a 14.600 g , durante 5 min, a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se recuperó con una micropipeta y se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de cloroformo equivalente al obtenido y se mezcló manualmente hasta obtener una suspensión coloidal. A continuación, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y se recuperó de nuevo el sobrenadante, transfiriéndolo a un tubo nuevo. El ADN se precipitó añadiendo 1,5 volúmenes de isopropanol frío (-20° C) y manteniendo la muestra a -20° C, un mínimo de 30 min. Tras la centrifugación de la muestra a 14.600 g durante 30 min, a 4° C, se obtuvo el precipitado, que posteriormente se limpió con 200 μ l de etanol 70% a -20° C y centrifugación en frío a 7.800 g durante 5 minutos. Tras descartar el sobrante de etanol, las muestras se secaron durante 30 min en una bomba de vacío y, por último, el ADN recuperado se resuspendió en 100 μ l tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Para facilitar la resuspensión, las muestras se incubaron a 50° C durante 15 min y posteriormente se almacenaron a -20° C hasta su utilización.

c) Amplificación de las regiones ITS, EF y β -tubulina

Se amplificó parte del operón nuclear del ARN ribosómico, incluyendo el gen 5.8S, los espaciadores intergénicos ITS1 y ITS2 y parte de los genes 18S y 28S, mediante los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al. 1990). Para la amplificación de una parte del gen EF1- α (factor de elongación) se emplearon los primers EF1-728F (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3') y EF1-986R (5' TACTTGAAGGAACCCTTACC 3') (Carbone et al. 1999). La amplificación de una parte de la región del gen de la β -tubulina se realizó mediante los primers Bt2a (5' GGTAACCAAATCGTGCTGCT TTC 3') y Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') (Glass y Donaldson 1995). Cada reacción se preparó con 1 μ l del extracto de ADN, 2 μ l de los cebadores correspondientes (10 μ M) (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), 20 μ l de Mastermix Eppendorf 2,5X (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y se enrasó a 50 μ l con agua estéril HPLC. Las reacciones se realizaron

en un termociclador 9700 de GeneAmp® PCR System (PE Applied Biosystem, Foster City, California, EE.UU.). La reacción de amplificación del ITS se inició con un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (20 s a 95° C), anillamiento (30 s a 55° C) y extensión (40 s a 72° C), para acabar con un ciclo de extensión final de 5 min a 72° C. El perfil de temperaturas para la amplificación de la β -tubulina y del EF fue idéntico, a excepción de la temperatura de anillamiento que se realizó a 58° C.

d) *Purificación de los amplicones*

Los productos obtenidos de las amplificaciones fueron purificados con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los amplicones se purificaron siguiendo las instrucciones del manual suministrado por el fabricante.

e) *Secuenciación de los amplicones*

e1) Reacción de PCR de secuenciación. Para cada región de ADN, se realizó la reacción de secuenciación de las dos cadenas que componen la doble hélice. Cada reacción se preparó con una cantidad de amplicón variable en función de la región a secuenciar (2 μ l ITS, 3 μ l EF y 1,5 μ l β -tubulina). El resto de reactivos fueron: 4 μ l de BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y 1 μ l del iniciador directo o reverso correspondiente (10 μ M) (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), todo ello enrasado a 10 μ l con agua estéril HPLC. Las reacciones se realizaron en un termociclador 9700 de GeneAmp® PCR System y se empleó el siguiente programa de temperaturas para la región ITS y EF: un ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 96° C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (10 s a 96° C), anillamiento (5 s a 50° C) y extensión (40 s a 60° C). El programa de temperaturas de la región β -tubulina se mantuvo prácticamente idéntico, modificando sólo la temperatura de anillamiento, a 52° C.

e2) Precipitación del ADN. Para el proceso se empleó el kit de precipitación etanol/EDTA/acetato de sodio de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Alemania) y se siguió el protocolo del BigDye[®] Terminator v1.1. Finalizado el proceso, las muestras se mantuvieron durante una noche a 4^o C.

e3) Secuenciación. Para resuspender el ADN obtenido de la reacción de secuenciación se añadió a cada tubo 12 µl de formamida Hi-Di[™] (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Los fragmentos de ADN resultantes se analizaron con un secuenciador de ADN automático 3130 de ABI Prism[®] (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se leyeron con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5 (Hall 1999), se comprobaron manualmente y se clarificaron las posiciones nucleotídicas ambiguas combinando la información de ambas hebras.

f) *Identificación molecular*

El último paso consistió en la identificación de los aislados mediante consultas en el registro nucleotídico de hongos de GenBank (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). En el sitio web se compararon las secuencias obtenidas en nuestro estudio con las almacenadas en esta base de datos para obtener un listado de aquellas más semejantes e identificar así nuestros aislados con aquellos de mayor similitud. En los casos en los que la identificación molecular mediante la región ITS no ofreció un resultado claro o no coincidió con la identificación morfológica, se procedió a la comparación de las otras dos regiones.

2.2.3 Análisis filogenético de las especies de Botryosphaeriaceae

La reconstrucción filogenética de las especies de Botryosphaeriaceae se realizó con 40 aislados, 20 de ellos pertenecientes a la colección del IRTA y el resto procedentes de GenBank (Tabla Anexo 2; Tabla Anexo 3). Se empleó una especie del Orden *Hypocreales* como grupo externo, que ya había sido empleada por otros autores (Luque et al. 2005). Se analizaron las secuencias de 3 regiones diferentes: ITS, EF y β -tubulina; en primer lugar, de forma aislada y posteriormente combinada. Las secuencias se alinearon con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5 (Hall 1999) y se ajustaron manualmente, en los casos en los que

fue necesario. Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa PAUP* versión 4.0b10 (Swofford 2003). Todos los caracteres tuvieron el mismo peso en el análisis, no se ordenaron y los espacios insertados en el alineamiento se trataron como un nuevo carácter. Se realizó una prueba de homogeneidad en PAUP (test Hompart basado en el test ILD, Farris et al. 1995) para conocer la posibilidad de combinar las diferentes regiones analizadas. Para la creación de los árboles se aplicó el criterio de máxima parsimonia (MP) mediante búsqueda heurística con opción de 1.000 adiciones aleatorias de taxones y solapamiento de ramas mediante bisección y reconexión (TBR). Se colapsaron las ramas de longitud cero y se conservaron los árboles igualmente parsimoniosos generados por el programa. La estabilidad de las ramas se calculó mediante 1.000 réplicas de *bootstrap* (Hillis y Bull 1993). Los árboles resultantes se visualizaron con el programa TreeView (Win32) versión 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). Debido a la imposibilidad de combinar las tres regiones, como se vio en los análisis preliminares, y a los cambios sufridos en la taxonomía del género *Botryosphaeria* (Crous et al. 2006), el Dr. Alan Phillips (Univ. Nova de Lisboa, Portugal) sugirió dividir el análisis filogenético en dos grandes grupos de anamorfos; por un lado, *Diplodia/Lasiodiplodia* (grupo 1), y por otro, *Fusicoccum/Neofusicoccum/Dothiorella* (grupo 2). El grupo 1 quedó compuesto por 16 aislados y el grupo 2 por 23. Para el grupo 1 se emplearon dos aislados de *Fusicoccum aesculi* (CBS 121484 y CMW8000) como grupos externos y para el grupo 2, los dos aislados de *Diplodia corticola* (CBS112547 y CBS112549). Se realizó de nuevo la prueba de homogeneidad para evaluar la posibilidad de combinar la información de las tres regiones nucleotídicas y el resto de análisis filogenéticos se realizaron siguiendo los pasos descritos anteriormente.

2.2.4 Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante amplificación cooperativa, hibridación *dot blot* y revelado colorimétrico

La aplicación de la técnica de la PCR-cooperativa junto con la hibridación *dot blot* y el revelado colorimétrico se basó en el protocolo de Olmos et al. (2002), modificado por Caruso et al. (2003) y por el equipo del *Laboratori de Sanitat Vegetal* del *DAR (Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya)*.

a) *Aislados fúngicos y material vegetal*

Para el diseño de la sonda se emplearon secuencias de la región ITS de 13 aislados de Botryosphaeriaceae secuenciados por nuestro equipo, así como 60 secuencias obtenidas de GenBank (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) (Tabla Anexo 2 y Tabla Anexo 3). De igual modo, se recopilaron 50 secuencias ITS de aislados de 12 especies asociadas al decaimiento de la vid (entre otras *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora*, y 9 especies de *Phaeoacremonium*). Las secuencias de 8 de los 12 aislados de *Phaeoacremonium* empleados fueron cedidas por la Dra. Rosa Raposo (INIA, Madrid). En los diferentes pasos del testado de la sonda se utilizaron un total de 12 especies de Botryosphaeriaceae, nueve de ellas empleadas en el diseño de la sonda junto con *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, Alves et Luque, *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves y *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves (Tabla Anexo 2). También se emplearon un total de nueve especies no Botryosphaeriaceae para el testado (*Cylindrocarpon* sp., *Cryptovalsa ampelina*, *E. lata*, *F. mediterranea*, *Pm. aleophilum*, *Pa. chlamydospora*, *Phomopsis viticola*, *Stereum hirsutum* y *Rosellinia necatrix*) (Tabla Anexo 2). Como control negativo se utilizó el extracto de una vid cultivada en condiciones *in vitro* de la variedad Garnacha tinta. La vid fue facilitada por la Dra. Victoria Marfà del departamento de Cultivo In Vitro y Transformación del IRTA de Cabrils. El extracto de ADN de la planta se obtuvo empleando el mismo protocolo de extracción aplicado para los hongos.

b) *Diseño de la sonda de hibridación*

Las secuencias ITS de todos los hongos se alinearon con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5 (Hall 1999). La búsqueda de regiones adecuadas para conformar la sonda específica de Botryosphaeriaceae se realizó con el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystem, Foster City, California, EE.UU.). A continuación, se verificó que las regiones escogidas cumplieren los criterios de longitud, temperatura de anclaje a la cadena de ADN y porcentaje de guaninas/citosinas detallados por Dieffenbach et al. (1993). Por último, se probó la especificidad de la región o regiones seleccionadas haciendo una doble comprobación. En primer lugar, se comprobó en el alineamiento que los fragmentos destacados no estuviesen

presentes en la región ITS de las especies no pertenecientes a Botryosphaeriaceae. En segundo lugar, se realizó una búsqueda en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para descartar que otros patógenos fúngicos de vid o incluso el propio hospedador presentasen, en cualquier parte de su genoma, el fragmento escogido. Realizadas estas comprobaciones, se procedió a validar mediante PCR, la región seleccionada (denominada *Bot*) como cebador específico en todos los hongos empleados en el estudio. Para ello, se empleó la pareja de iniciadores ITS1 (como cebador genérico y directo) y *Bot* (como cebador específico y reverso). Cada reacción se preparó con 1 µl de ADN, 20 µl de Mastermix 2.5X (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), 2 µl de cada primer (10 µM) (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania) y se enrasó a un volumen final de 50 µl con agua estéril HPLC. Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700. El perfil de temperaturas utilizado fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (20 s a 95° C), anillamiento (30 s a 58° C) y extensión (40 s a 72° C) y finalmente una extensión de 5 min a 72° C. El resultado de la amplificación se analizó mediante un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Una vez confirmada la especificidad de la región *Bot*, se inició el proceso de amplificación a través de Co-PCR, seguido de la hibridación y del revelado colorimétrico.

c) *Amplificación mediante Co-PCR*

Se emplearon dos parejas de iniciadores genéricos: NSA3-NLC2, más externa, y NSI1-NLB4, interna a la anterior (Martin y Rygiewicz 2005), para amplificar una región del gen nuclear 5,8S de ARN ribosómico y sus regiones adyacentes ITS (Figura 2.1). La región amplificada por estos cuatro cebadores contiene la región *Bot* sobre la que se diseñó la sonda de hibridación *Bot*. Cada reacción se preparó con el cóctel Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) al que se añadió 1 µl del extracto de ADN fúngico, 0,5 µl de cada primer (10 µM) (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania) y 22 µl de agua estéril HPLC para ajustar a un volumen final de 25 µl.

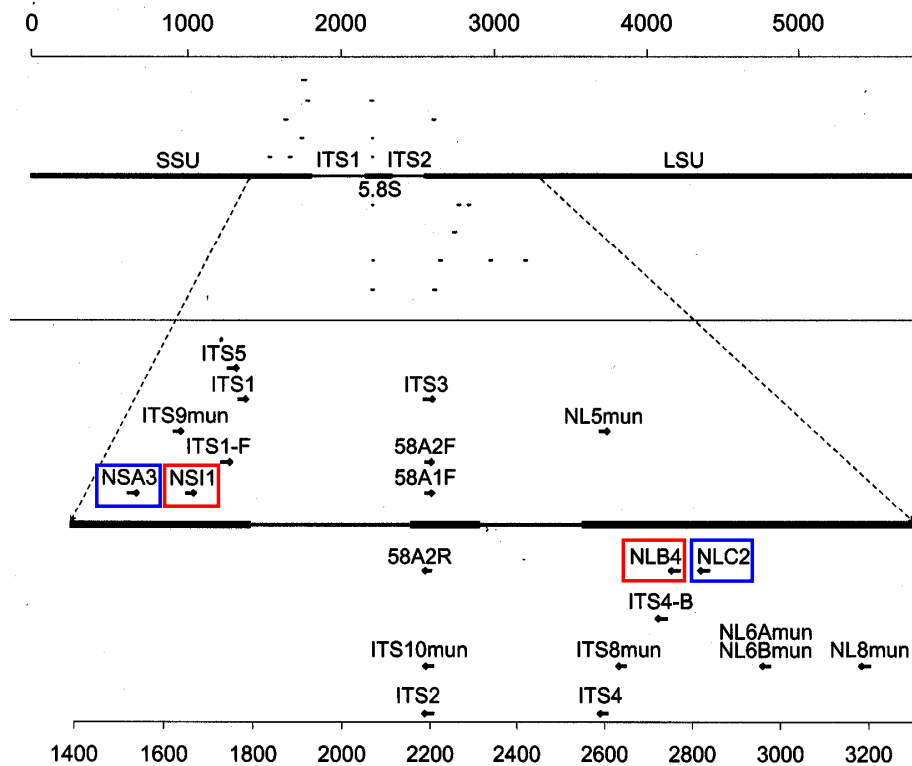


Figura 2.1 Localización de los iniciadores empleados en la Co-PCR sobre la región SSU, ITS1, 5,8S, ITS2 y LSU del ADN ribosómico. Los cebadores directos están situados por encima y los reversos por debajo de su posición de anclaje a la región genómica. Unidades de las escalas superior e inferior en pares de bases. Las parejas de iniciadores utilizados en el estudio se muestran encuadradas en azul y rojo. Diagrama extraído de Martin y Rygiewicz (2005).

La reacción de PCR se inició con un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95° C, seguido de 60 ciclos de desnaturalización (30 s a 94° C), anillamiento (1 min a 50° C) y extensión (2 min a 72° C), para acabar con un ciclo de extensión final de 10 min a 72° C. Las amplificaciones se llevaron a cabo con un termociclador Progene (Techne, Stone, Staffordshire, Reino Unido). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV.

d) *Detección colorimétrica mediante hibridación dot blot de los amplicones*

La detección colorimétrica de las muestras de Botryosphaeriaceae se realizó mediante el marcaje de la sonda *Bot* diseñada. La sonda se marcó con digoxigenina en el extremo 3' (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania) y se empleó el kit *DIG Wash and Block Buffer*

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para la detección inmunológica de sondas marcadas.

- d1) Fijación de los amplicones a la membrana. Los amplicones se calentaron durante 10 min a 94° C y se dispusieron en hielo inmediatamente después para conseguir la desnaturalización del ADN y poder así unir las hebras de ADN a la membrana de nylon cargada positivamente. Una vez depositado 1 µl de los amplicones desnaturalizados sobre la membrana, se dejaron secar a temperatura ambiente y se expusieron durante 5 min a luz UV para favorecer la fijación de los amplicones.
- d2) Prehibridación. Se sometieron las membranas a una fase previa de hibridación en el horno Roller-Blot HB-3D (Techne, Stone, Staffordshire, Reino Unido). Para ello, en uno de los tubos del horno, se bañó la membrana con 20 ml de tampón estándar de hibridación (5X SSC, 0,1% (p/v) N-lauroyl-sarcosina, 0,1 mg/ml Poly A (Sigma), 0,02% (p/v) SDS y 1% agente bloqueante) y se mantuvo en rotación 1 hora a 60° C.
- d3) Hibridación. Se desechó el tampón de hibridación de la fase anterior y se añadió un volumen similar del mismo tampón en el que estaba diluida la sonda específica *Bot*, en una concentración de 5 pmol/ml. Se mantuvo la membrana cargada hibridando en rotación con la sonda a 60° C. Transcurridas 2 horas, se extrajo la membrana del horno y se lavó dos veces (5 min/lavado) en solución de lavado A (2X SSC con 0,1% SDS), más 3 lavados en solución de lavado B (0,5X SSC con 0,1% SDS). A continuación, se equilibró la membrana con tampón de lavado 1X (100 mM de ácido maleico, 150 mM de NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20, pH 7,5) durante 1 min.
- d4) Detección colorimétrica. Para este último paso, se empleó el kit de detección de ácidos nucleicos DIG (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). En primer lugar, se equilibró la membrana durante 2 min cubriéndola con tampón de lavado 1X y posteriormente se bloqueó con 250 mg de agente bloqueante añadidos a la solución durante 30 min en rotación. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina y se dejó reaccionar media hora más. Una vez finalizada la reacción, se lavó 3 veces la membrana en tampón de lavado 1x y se sumergió en la solución de detección (315 µg/ml NBT y 175 µg/ml BCIP en 100 mM Tris-HCl y 100mM NaCl, pH

9,5). La reacción colorimétrica se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurridos 40 min aproximadamente, la reacción se paró mediante el lavado de la membrana con agua.

e) *Sensibilidad de la técnica*

Para conocer el nivel de detección de la técnica, se cuantificó la concentración de ADN de un aislado de *Di. seriata* (JL395) y otro de *N. parvum* (JL499). La cuantificación de ADN se realizó con ayuda de un espectrofotómetro de GenRay (Biometra, Gotingen, Alemania). Una vez medida la concentración de ADN de ambos aislados, se realizaron nueve diluciones seriadas del extracto, desde 10^{-1} a 10^{-9} . Las diferentes diluciones fueron amplificadas mediante Co-PCR y sometidas al proceso de hibridación y revelado colorimétrico explicado anteriormente. La amplificación, hibridación y revelado fue repetido una segunda vez para asegurar la reproducibilidad del método.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificación y caracterización morfológica de especies de Botryosphaeriaceae

Los rasgos más destacables de la morfología de las especies en base a las estructuras reproductoras se muestran en la [Tabla 2.1](#) y en las figuras de los conidios ([Figura 2.2 a-g](#)) y de las colonias ([Figura 2.3 a-d](#)). La forma, coloración y septación de los conidios fue el carácter más útil para diferenciar entre los anamorfos de *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Diplodia* y *Dothiorella*. Las características de las células conidiógenas y de la conidiogénesis presentaron diferencias poco patentes entre los principales géneros de anamorfos. Para el género *Diplodia*, se utilizó la coloración y el tamaño de los conidios para diferenciar las dos especies en estudio. *Diplodia mutila* presentó conidios mayoritariamente hialinos y de mayores dimensiones que los *Di. seriata*, de menores dimensiones y que se oscurecen rápidamente. *Dothiorella viticola* presentó conidios coloreados y septados ya en el interior del picnidio y con la relación longitud/anchura (L/A) menor de todas las especies. Entre *Fusicoccum* y *Neofusicoccum*, la principal diferencia fue el tamaño de los conidios y la relación L/A, aunque

Tabla 2.1 Caracteres morfológicos de los conidios y de la conidiogénesis de las siete especies Botryosphaeriaceae estudiadas.

Anamorfo	Especie	Aislados ^a	Cel. conidiógenas	Conidiogénesis	Caracteres de los conidios				
					Forma	Color	Septo	Tamaño (µm)	
								Longitud ± d. est. Anchura ± d. est.	Ratio L/A ± d. est.
<i>Diplodia</i>	<i>Di. mutila</i>	JL368	Hialinas	Percurrentes	Extremos redondeados	Hialinos, oscureciéndose	Suelen septarse al envejecer	(23)-25,3-(29) ± 0,2 (9)-12-(14) ± 0,2	2,41 ± 0,02
		JL351	Cilíndricas	Determinadas (engrosamientos periclinales) o indeterminadas (2-3 anélicas)	Ovato-cilíndricos con cicatriz de unión a la célula conidiógena bastante aparente	Inicialmente hialinos y suelen oscurecerse. Color marrón desde claro a intenso	Aseptados aunque pueden septarse justo antes de la germinación	(17)-21,8-(29) ± 0,2 (7)-9,1-(12) ± 0,1	2,13 ± 0,03
	CBS 121485	Holoblásticas							
	JL421								
	JL426								
	JL471 JL482								
<i>Dothiorella</i>	<i>Do. viticola</i>	CBS 117006	Hialinas	Percurrentes	Extremos redondeados	Coloreados desde estadios iniciales del desarrollo, incluso cuando el conidio se encuentra unido a la célula conidiógena	Septados desde estadios iniciales del desarrollo	(16)-20,6-(23) ± 0,1 (8)-10-(11) ± 0,1	2,06 ± 0,01
		CBS 117008	Cilíndricas, ligeramente engrosadas en la base	Determinadas (engrosamientos periclinales) o raramente indeterminadas (2-3 anélicas)	Ovoides				
		JL570	Holoblásticas						
<i>Fusicoccum</i>	<i>B. dothidea</i>	CBS 121484	Hialinas	Primer conidio holoblástico	Elípticos o fusiformes	Hialinos, se pueden oscurecer parcialmente antes de germinar	Aseptados pudiendo septarse antes de germinar	(19)-24,4-(29) ± 0,2 (4)-5,4-(8) ± 0,1	4,55 ± 0,06
		JL380	Cilíndricas	Percurrentes					
			Enteroblásticas	Determinadas o indeterminadas (2-3 anélicas)					
<i>Neofusicoccum</i>	<i>N. luteum</i>	JL381	Hialinas	Primer conidio holoblástico	Elípticos o fusiformes	Hialinos, se pueden oscurecer parcialmente antes de germinar	Aseptados pudiendo septarse antes de germinar	(15)-21,1-(26) ± 0,3 (6)-7,1-(8) ± 0,1	2,99 ± 0,04
		JL352 JL382	Cilíndricas	Percurrentes				(11)-15,2-(20) ± 0,2 (5)-6,4-(9) ± 0,1	2,41 ± 0,03
	<i>N. vitifusiforme</i>	CBS 121481	Enteroblásticas	Determinadas o indeterminadas (2-3 anélicas)				(19)-22,8-(26) ± 0,2 (5)-5,3-(6) ± 0,1	4,37 ± 0,08

^a Cultivos: JL (IRTA, Cabrils, Barcelona) y CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Países Bajos).

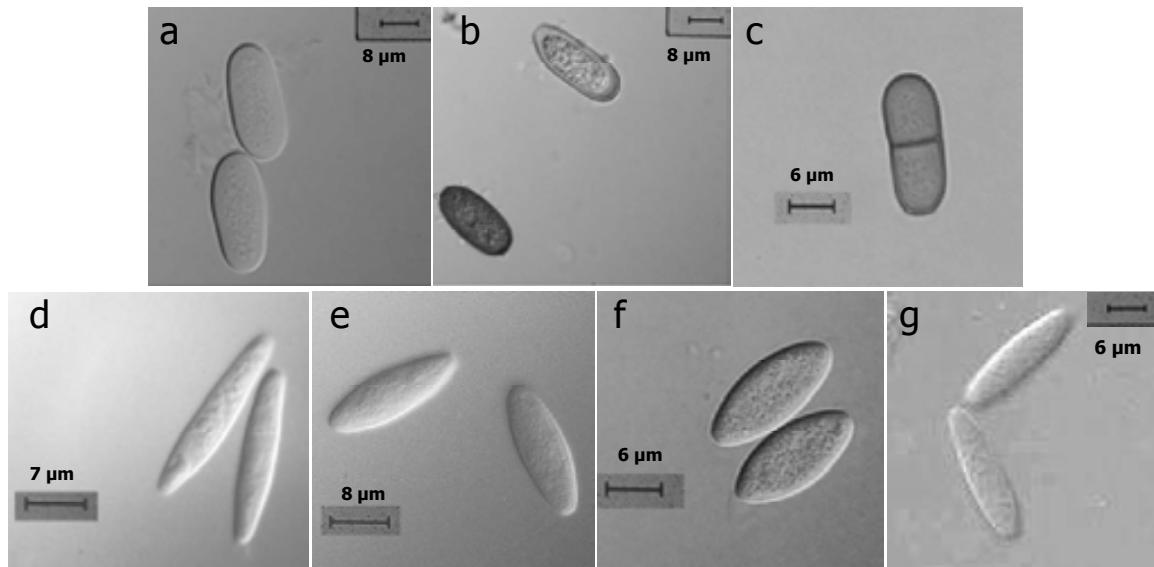


Figura 2.2 Conidios de: *Diplodia mutila* (a), *Diplodia seriata* (b), *Dothiorella viticola* (c), *Botryosphaeria dothidea* (d), *Neofusicoccum luteum* (e), *Neofusicoccum parvum* (f), *Neofusicoccum vitifusiforme* (g).

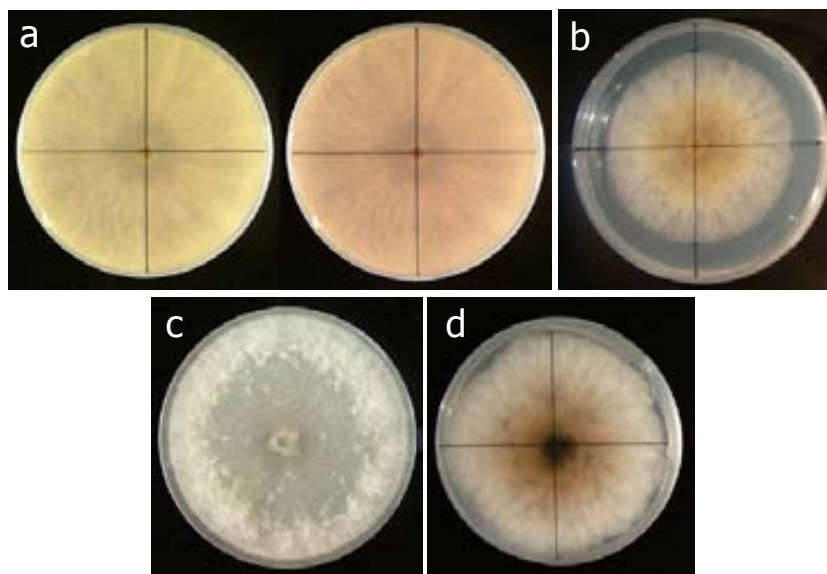


Figura 2.3 Detalle del pigmento amarillo que vira a rosado en *Neofusicoccum luteum* (a). Detalle del micelio amarillento de *Neofusicoccum parvum* (b). Detalle de la falta de micelio aéreo en torno al inóculo en *Diplodia seriata* (c). Detalle del pigmento rosado de apariencia errática en *Dothiorella viticola* CBS 117006 (d).

sólo tres especies pudieron diferenciarse claramente. *Botryosphaeria dothidea* presentó los conidios más largos y estrechos, lo que da una relación L/A muy grande (4,55), mientras que, *N. parvum* mostró los más pequeños (L/A = 2,41), y *N. luteum* intermedios (L/A = 2,99). Los conidios de *N. vitifusiforme* mostraron características intermedias entre los de *B. dothidea* y

N. luteum. La relación L/A entre los conidios de *B. dothidea* y *N. vitifusiforme* fue muy similar (4,55 y 4,37, respectivamente), lo que no permitió su diferenciación.

Los caracteres más destacables de la morfología de las colonias se recogen en la [Tabla 2.2](#). Algunos de estos caracteres pueden ayudar a la identificación de determinadas especies, como por ejemplo la producción de pigmento en *N. luteum* ([Figura 2.3a](#)). Esta especie tiñe el medio de PDA de un color amarillento que vira a rosado entre el tercer y cuarto día. Los dos aislados de *N. parvum* mostraron, en los primeros días de su crecimiento, una coloración amarilla del micelio en torno al inóculo, apreciable en el reverso de la placa ([Figura 2.3b](#)). Otra especie que mostró una característica peculiar en su desarrollo fue *Di. seriata*, que formó escaso micelio aéreo en torno al anillo central ([Figura 2.3c](#)). El aislado CBS 117006 de *Do. viticola* ([Figura 2.3d](#)) generó un pigmento rosado aunque su aparición fue errática y no se pudieron determinar las condiciones que la inducen. Este pigmento no apareció en los otros dos aislados estudiados (CBS 117008 y JL570), que por el contrario mostraron una coloración verdosa del micelio en la parte superior y negro-verdosa en la inferior.

Tabla 2.2 Características de las colonias de distintas especies Botryosphaeriaceae en medio PDA.

Especie	Micelio	Coloración del micelio			Pigmento	
		Superior	Inferior	cambio de color	color	cambio al 3º ó 4º día
<i>B. dothidea</i>	Muy abundante	Hialino	Oscurecimiento en torno al inóculo	Oscurecimiento progresivo hacia negro/grisáceo	-	-
<i>Di. seriata</i>	Escaso en anillo central	Hialino	Hialino	Idem <i>B. dothidea</i>	-	-
<i>Di. mutila</i>	Abundante	Hialino	Hialino	Idem <i>B. dothidea</i>	-	-
<i>Do. viticola</i>	Abundante	Verdoso	Negro-verdoso	Idem <i>B. dothidea</i>	Rosado ^a	Rojizo
<i>N. luteum</i>	Escaso	Hialino	Hialino	Idem <i>B. dothidea</i>	Amarillo	Rosado
<i>N. parvum</i>	Abundante	Hialino	Leve amarilleamiento en torno al inóculo	Idem <i>B. dothidea</i>	-	-
<i>N. vitifusiforme</i>	Abundante	Hialino	Ligero color oliváceo en torno al inóculo	Idem <i>B. dothidea</i>	-	-

^a Aparición errática del pigmento. Exclusivo del aislado CBS 117006. No presente en los aislados CBS 117008 y JL570.

Las características más importantes del crecimiento de las colonias a distintas temperaturas se resumen en la [Tabla 2.3](#). Los aislados de las diferentes especies mostraron un patrón de desarrollo muy similar en los tres medios de cultivo utilizados, obteniéndose el mayor crecimiento en PDA, seguido de MEA y, por último, CMA ([Figura 2.4 a-c](#)). La mayoría de los aislados comenzaron a desarrollarse apreciablemente a partir de los 15° C, deteniendo su crecimiento a 35° C. El rango de temperaturas óptimas se registró entre los 20 y 30° C, estando la mayoría entre 25 y 30° C. Sin embargo este óptimo varió dentro de un mismo aislado en función del medio de cultivo. En general, las curvas de crecimiento muestran perfiles similares, con un crecimiento exponencial hasta la temperatura óptima y seguida de una reducción más o menos brusca del crecimiento. *Botryosphaeria dothidea*, sin embargo, presentó un perfil más suave con un crecimiento menor que otras especies hasta los 20° C, siendo, junto con *N. vitifusiforme*, las únicas que mostraron un desarrollo significativo a 35° C. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* fueron las especies que registraron los mayores crecimientos. El patrón de crecimiento de *Do. viticola* fue también particular, con un desarrollo considerable a 10 y 15° C y con el óptimo a 20° C.

Tabla 2.3 Crecimiento de las especies de Botryosphaeriaceae a distintas temperaturas y en PDA.

El crecimiento medio a 25 y 30° C corresponde a los tres medios de cultivo utilizados (PDA, MEA y CMA).

Especie	T ^a mínima	T ^a óptima	Medio óptimo	Crec. medio 25° C (mm)	± d. est.	Crec. medio 30° C (mm)	± d. est.	Observaciones
<i>B. dothidea</i>	15	30	PDA	21	6,23	22	5,10	Crecimiento a 35° C
<i>Di. seriata</i>	15	25	PDA	25	5,39	22	2,59	
<i>Di. mutila</i>	15	25	PDA	26	4,58	17	4,80	
<i>Do. viticola</i>	10	20	PDA	17	5,58	10	1,10	Mayor crecimiento a baja T ^a
<i>N. luteum</i>	15	30	PDA	22	2,29	29	5,45	Mayor crecimiento en MEA a 25° C
<i>N. parvum</i>	15	30	PDA	30	5,64	35	8,27	Mayor crecimiento en PDA y CMA
<i>N. vitifusiforme</i>	15	30	PDA	15	2,5	18	3,3	Crecimiento a 35° C

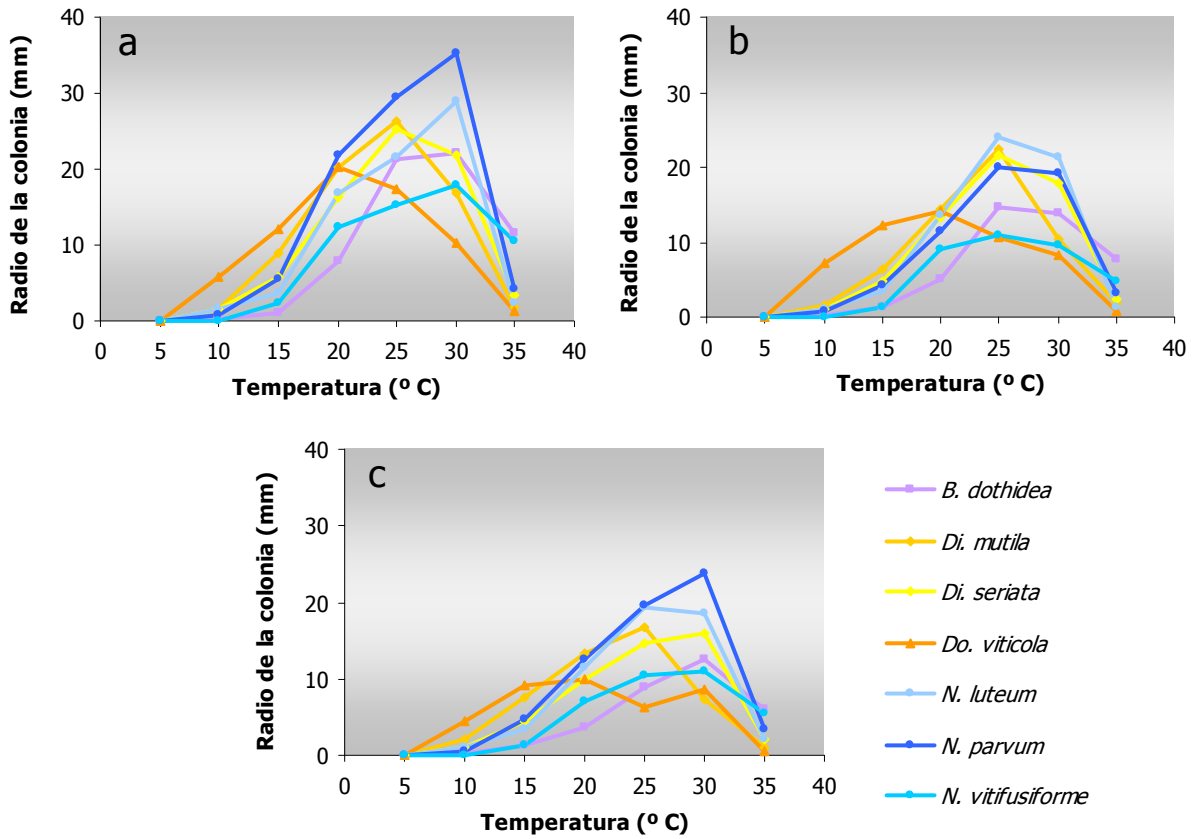


Figura 2.4 Tasas de crecimiento radial de aislados de distintas especies de Botryosphaeriaceae a los 2 días de incubación en tres medios de cultivo PDA (a), MEA (b), CMA (c).

Mediante la información obtenida de los caracteres del anamorfo, de las colonias y del crecimiento en placa se ha confeccionado una clave dicotómica para la identificación de las especies de Botryosphaeriaceae halladas sobre vid.

Clave para la identificación de especies de Botryosphaeriaceae en *Vitis*

1. Conidios septados o no, mayoritariamente oscuros ya en el interior del picnidio.....**2**
1. Conidios mayoritariamente hialinos en el interior del picnidio, muy raramente septados u oscuros (cf. *Di. mutila*).....**3**
2. Conidios mayoritariamente septados. Longitud de los conidios en cultivo raramente superando los 23 µm. Crecimiento a 10 y 15° C, con el óptimo a 20°C***Dothiorella viticola***
2. Conidios mayoritariamente aseptados (ocasionalmente, con 1 septo previo a la germinación). Longitud de los conidios superando con facilidad los 23 µm.....***Diplodia seriata***

3. Conidios de pared fina y casi nunca excediendo los 10 μm de anchura, fusiformes a ovals.....**4**
3. Conidios de pared gruesa y de anchura superior a los 11 μm , cilíndricos. Conidios hialinos después de su liberación, oscureciéndose y septándose tan sólo ocasionalmente (1 septo).....***Diplodia mutila***
4. Colonia en PDA con un tenue pigmento amarillo que difunde por toda la placa a los 3-4 días (25°C), rápidamente virando a rosado y oscureciendo levemente.....***Neofusicoccum luteum***
4. Colonia sin pigmentación amarilla en el reverso, aunque si está presente, ésta queda restringida a la zona central (cf. *N. parvum*). Reverso de la placa que se oscurece sin adquirir tonos rosados.....**5**
5. Conidios superando habitualmente los 20 μm de longitud, fusiformes a ovals, ratio L/A 3,9—5,0; presencia de microconidios rara. Colonia sin pigmentación amarilla en el reverso.....**6**
5. Conidios raramente excediendo los 20 μm de longitud, ovals, ratio L/A 2,0—3,5. Microconidios en algunos aislados. Ocasionalmente, pigmentación amarilla en la zona central del reverso de la placa.....***Neofusicoccum parvum***
6. Conidios que superan a menudo los 26 μm de longitud y los 6 μm de anchura.....***Botryosphaeria dothidea***
6. Conidios que rara vez alcanzan los 26 μm de longitud y los 6 μm de anchura.....***Neofusicoccum vitifusiforme***

2.3.2 Identificación y caracterización molecular y filogenia de especies de

Botryosphaeriaceae

El resultado de la prueba de homogeneidad indicó que los datos de las tres regiones del ADN estudiadas no conforman la misma filogenia ($p < 0,01$) y, por tanto, no pudieron combinarse para obtener el árbol consenso. De los 549 caracteres totales de la región ITS, 310 fueron constantes, 108 no informativos y 131 informativos. Por su parte, la región EF ofreció 46 caracteres constantes, 45 no informativos y 190 informativos de los 281 totales. Por último, las secuencias de la β -tubulina mostraron 424 caracteres, de los cuales 210 resultaron constantes, 95 no informativos y 119 informativos. El análisis de máxima parsimonia generó 24 árboles para la región ITS (árbol muestra en [Figura 2.5](#)), 24 para la EF ([Figura 2.6](#)) y dos para la β -tubulina ([Figura 2.7](#)). Los árboles de cada una de las regiones estudiadas no consiguieron separar de forma congruente los diferentes géneros anamórficos. Al comparar las filogenias entre sí, se apreciaron grandes diferencias en la organización de los clados. En la filogenia de la región ITS ([Figura 2.5](#)), el grupo *Fusicoccum* se encuentra incluido dentro de dos grupos de

Neofusicoccum. Las especies de *Dothiorella* aparecen en dos clados diferentes, con *Do. iberica* y *Do. viticola* separadas en dos grupos. En el otro gran grupo, las especies de *Diplodia mutila* quedan divididas en dos clados, con las especies que no proceden de vid agrupadas con las especies de *Di. corticola*. El árbol obtenido de la región EF (Figura 2.6) ofrece una resolución más clara del clado *Fusicoccum*/*Neofusicoccum* mientras que, en *Diplodia*/*Lasiodiplodia*, las especies de *L. theobromae* aparecen relacionadas con *Di. corticola*. El árbol de la región β -tubulina (Figura 2.7) muestra una incongruencia para las especies de *Dothiorella*, que separa a *Do. viticola* de *Do. iberica*.

Al dividir los taxones en dos grupos, siguiendo la sugerencia del Dr. A. Phillips, *Diplodia*/*Lasiodiplodia* (grupo 1) y *Fusicoccum*/*Neofusicoccum*/*Dothiorella* (grupo 2), se pudieron tratar las tres regiones de forma conjunta. Las pruebas de homogeneidad mostraron probabilidades no significativas para ambos grupos ($p = 0,155$ para el grupo 1 y $p = 0,062$ para el grupo 2), lo que permitió combinar las tres regiones. La división de los grupos también permitió obtener filogenias congruentes con una delimitación clara de los géneros y especies en estudio. En el grupo 1 (Figura 2.8a), se resolvieron los dos principales clados con la división de *Diplodia* y *Lasiodiplodia* (100% de soporte de *bootstrap*). Dentro de *Diplodia* se separaron, con un 99%, las especies de *Di. corticola* de *Di. seriata* y *Di. mutila* y con un 56% estas dos últimas. El clado de *Di. mutila* quedó dividido en dos (98%), uno con las especies procedentes de vid y otro con las especies de otros huéspedes. En todas las filogenias construidas, las especies de *Di. mutila* quedan segregadas en función del hospedador. Los aislados procedentes de *Vitis* formaron un clado independiente y acotado de los aislados de *Pyrus* L. y *Fraxinus* L. Para el grupo 2 (Figura 2.8b), la primera bifurcación del árbol resolvió, con un 100% de soporte, el clado de *Fusicoccum*, y la segunda bifurcación, el de *Neofusicoccum* y *Dothiorella* (59% de *bootstrap*). Dentro de *Dothiorella*, las dos especies analizadas quedaron claramente separadas en dos clados (100% *bootstrap*). Las especies de *Neofusicoccum parvum* quedaron soportadas por un 99% de *bootstrap*, mientras que el aislado de *N. vitifusiforme* quedó acotado con un 87% de soporte. Esta filogenia no permitió discriminar el aislado de *N. luteum* en un clado independiente sino que apareció incluido dentro de *N. australe*.

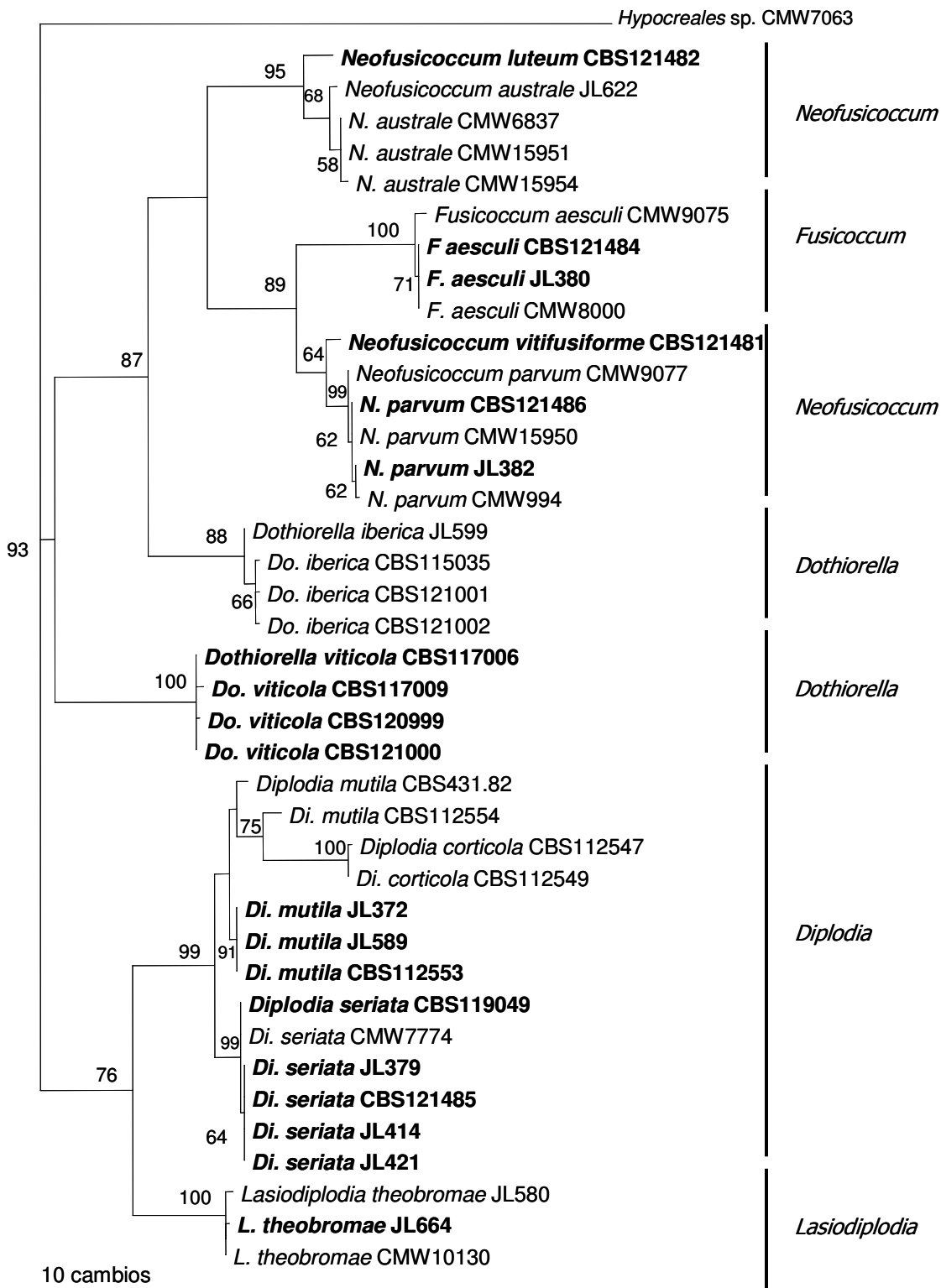


Figura 2.5 Uno de los 24 árboles más parsimoniosos obtenidos para la región ITS. Los valores de los 1.000 *bootstrap* se presentan en los nodos. El árbol se enraíza con el aislado *Hypocreales* sp. CMW7063. Los taxones en negrita proceden de vid. La barra representa 10 cambios.

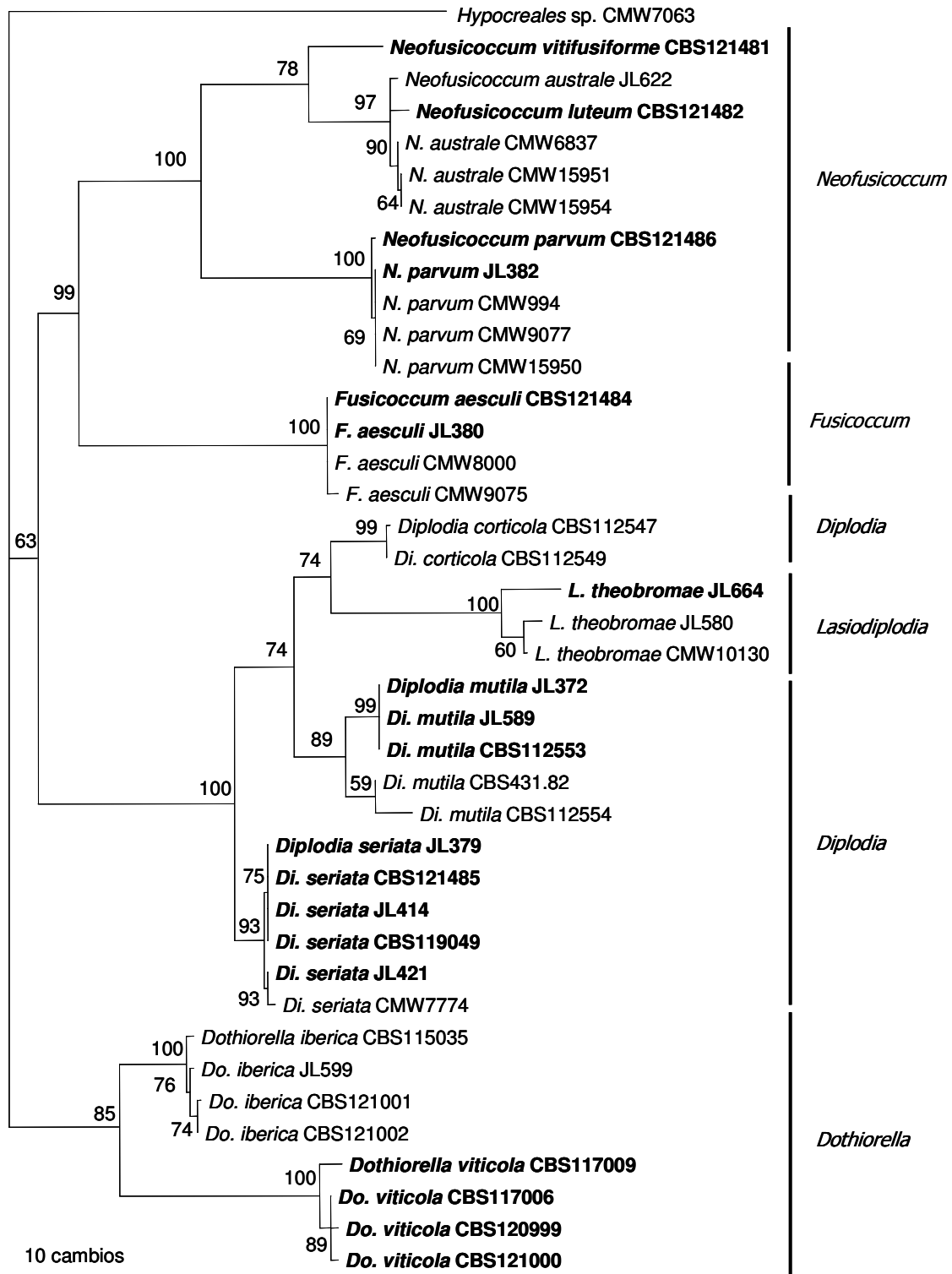


Figura 2.6 Uno de los 24 árboles más parsimoniosos obtenidos para la región EF. Los valores de los 1.000 *bootstrap* se presentan en los nodos. El árbol se enraíza con el aislado *Hypocreales* sp. CMW7063. Los taxones en negrita proceden de vid. La barra representa 10 cambios.

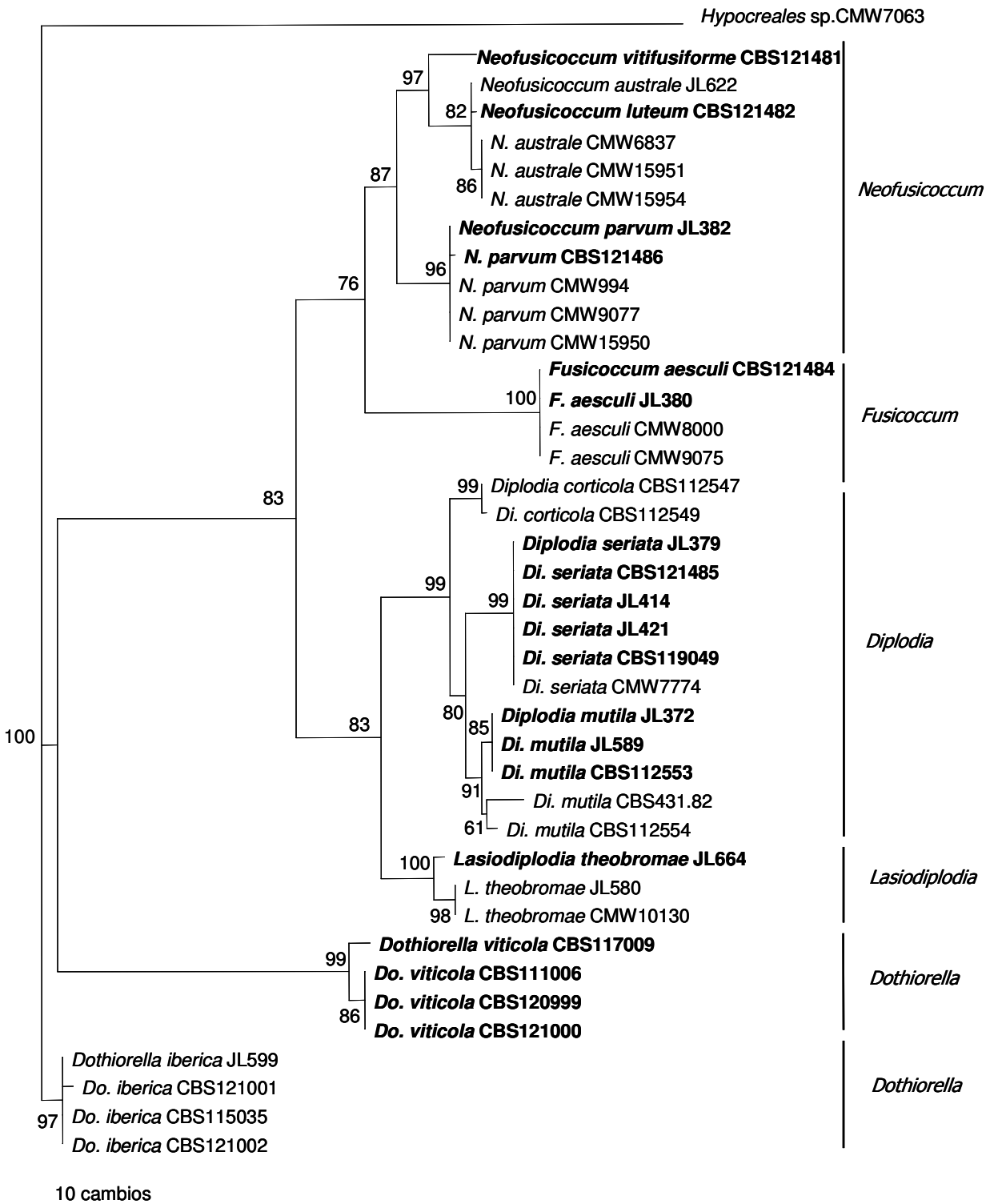


Figura 2.7 Uno de los dos árboles más parsimoniosos obtenidos para la región β -tubulina. Los valores de los 1.000 *bootstrap* se presentan en los nodos. El árbol se enraíza con el aislado *Hypocreales* sp. CMW7063. Los taxones en negrita proceden de vid. La barra representa 10 cambios.

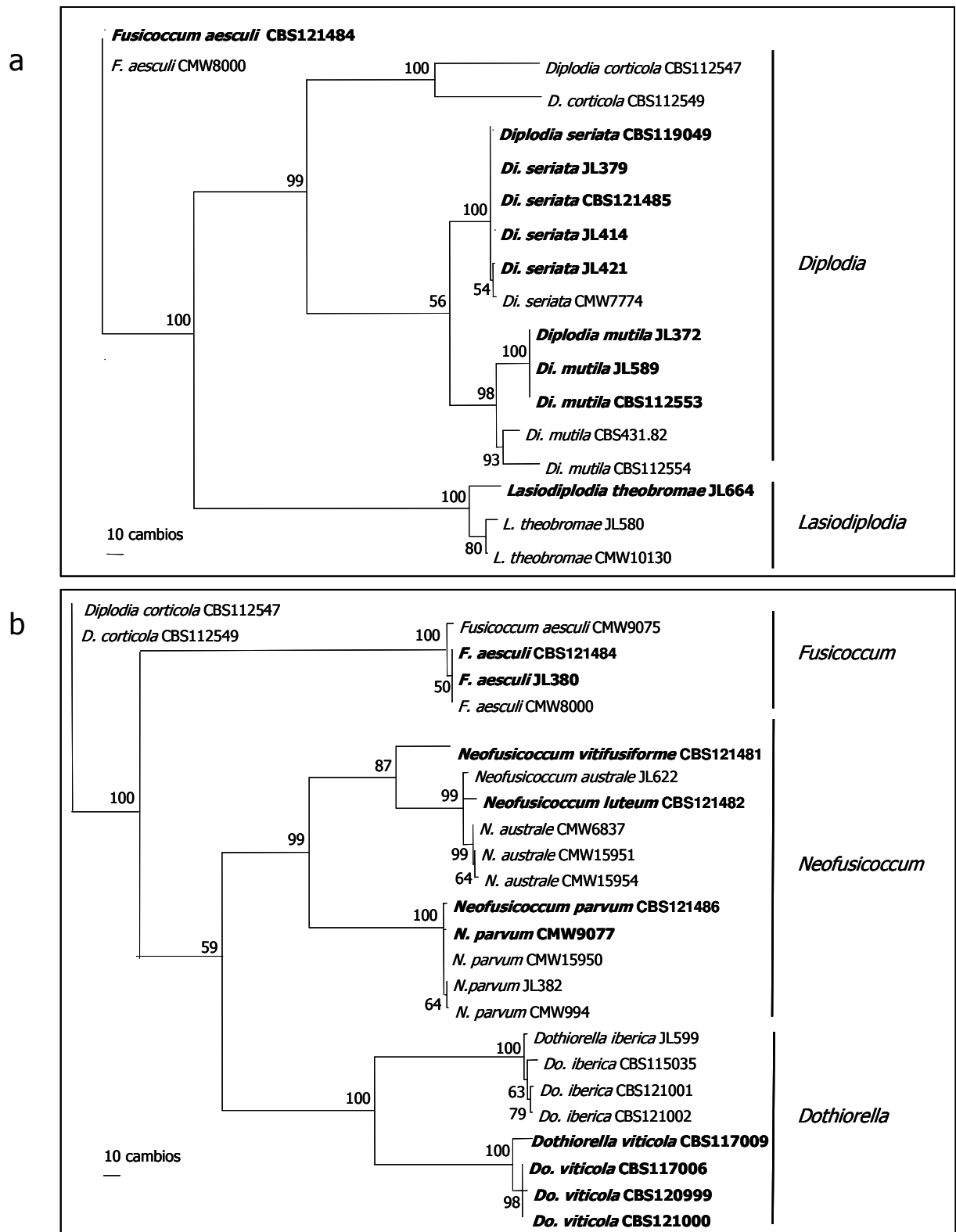


Figura 2.8 Único árbol parsimonioso obtenido para la combinación de ITS, EF y β -tubulina del grupo *Diplodia/Lasiodiplodia*. Outgroups: *Fusicoccum aesculi* (CBS 121484 y CMW8000) **(a)**. Uno de los 24 árboles más parsimoniosos obtenidos para la combinación de ITS, EF y β -tubulina del grupo *Fusicoccum/Neofusicoccum*. Outgroups: *Diplodia corticola* (CBS112547 y CBS112549) **(b)**. Los valores de los 1.000 *bootstrap* se presentan en los nodos. Los taxones en negrita proceden de vid. La barra representa 10 cambios.

2.3.3 Detección específica de especies de Botryosphaeriaceae mediante

amplificación cooperativa, hibridación dot blot y revelado colorimétrico

Una vez alineadas todas las secuencias para el diseño de la sonda, se localizó una zona específica de Botryosphaeriaceae en torno a las bases 370 y 390 de la región ITS, a partir de la posición inicial determinada por el primer ITS1. Dicha región *Bot* de 18 pares de bases (5' CCCTCAAGCTCTGCTTGG 3') se encontró presente en todas las especies de Botryosphaeriaceae analizadas y ausente en el resto de especies del estudio que no componen esta familia (Figura 2.9). También se confirmó la ausencia de la región escogida en el genoma de vid y se verificó así la inexistencia de anclajes en el hospedador y en el resto de especies fúngicas que puedan coexistir con las especies de Botryosphaeriaceae en la vid.

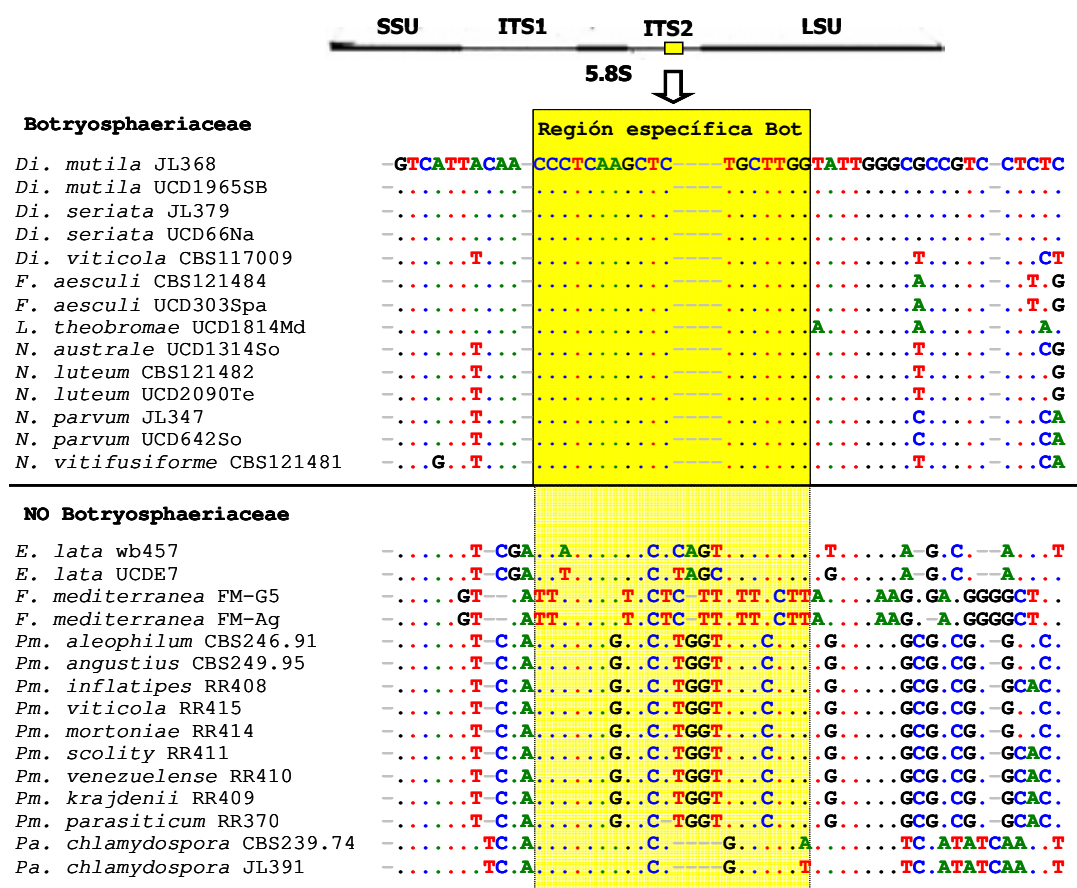


Figura 2.9 Detalle de la ubicación de la región específica *Bot* (amarillo) en parte del operón del ADN sobre el diagrama extraído de Martin y Rygiewicz (2005) y alineamiento de las secuencias parciales de la región ITS de las especies en estudio. En el alineamiento y encuadrado en amarillo, aparece la región específica presente en todas las especies de Botryosphaeriaceae (parte superior) y ausente en el resto (parte inferior). Las secuencias JL proceden de la colección del IRTA, las RR de la colección de la Dra. Rosa Raposo (INIA, Madrid) y el resto de GenBank.

Tanto la longitud de la región seleccionada (18 pares de bases) como su temperatura de anclaje a la cadena de ADN (55,6° C) y el porcentaje guanina/citosina (61,1%) resultaron óptimos para el diseño de iniciadores según los criterios fijados por Dieffenbach et al. (1993). En las sucesivas PCR realizadas, el cebador diseñado (*Bot*) actuó como reverso en combinación con el primer genérico ITS1 que lo hizo como directo. La pareja de iniciadores ITS1-*Bot* amplificaron de forma específica el ADN de las 12 especies de la familia Botryosphaeriaceae incluidas en la prueba (Tabla Anexo 2; Figura 2.10, detalle de siete especies). Los extractos de ADN del resto de patógenos ensayados (*Cylindrocarpon* sp., *C. ampelina*, *E. lata*, *F. mediterranea*, *Pm. aleophilum*, *Pa. chlamydospora*, *P. viticola*, *R. necatrix* y *S. hirsutum*), así como el de *Vitis vinifera*, resultaron negativos en la amplificación (Figura 2.10).

Posteriormente, se procedió a aplicar la técnica descrita por Olmos et al. (2002) y modificada por Caruso et al. (2003) basada en la hibridación *dot blot* acoplada a la reacción Co-PCR y posterior revelado colorimétrico. Los productos de la Co-PCR revelaron para todas las especies fúngicas ensayadas una banda mayoritaria en el gel de agarosa correspondiente al amplicón de mayor tamaño (1.300 bp), formado por la pareja de cebadores NSA3- NLC2 y por los amplicones menores que sirven a su vez de iniciadores (Figura 2.11, detalle de siete especies). El empleo de la sonda *Bot* marcada con digoxigenina en la hibridación *dot blot* de los productos resultantes de la Co-PCR mostró una especificidad única para las especies de Botryosphaeriaceae (Figura 2.12, casillas A1-A7). El resto de las especies ensayadas *F. mediterranea*, *E. lata*, *C. ampelina*, *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum*, *P. viticola*, *S. hirsutum* y *Cylindrocarpon* sp. mostraron resultados negativos (Figura 2.12, casillas A8-B7), así como el control que contenía el ADN de *Vitis* (Figura 2.12, casilla B8).

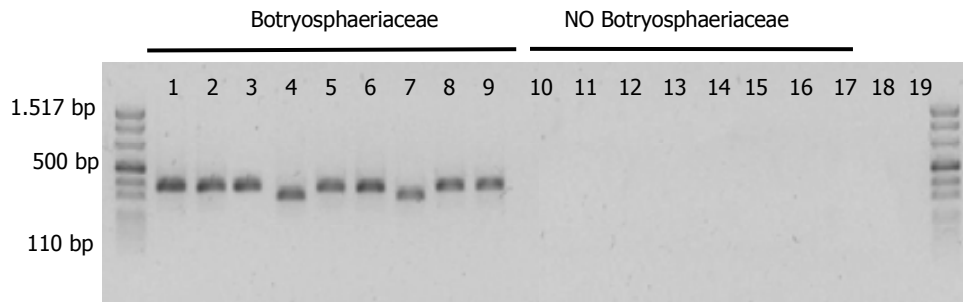


Figura 2.10 Productos de PCR amplificados con el iniciador *Bot* diseñado para la detección de Botryosphaeriaceae y el iniciador ITS1 como pareja. Columnas 1-9: Aislados de Botryosphaeriaceae de vid (1: *Diplodia mutila*, 2-3: *Neofusicoccum parvum*, 4: *N. luteum*, 5-6: *Di. seriata*, 7: *N. vitifusiforme*, 8: *Botryosphaeria dothidea* y 9: *Dothiorella viticola*). Columnas 10-17: Especies no Botryosphaeriaceae (10: *Fomitiporia mediterranea*, 11: *Eutypa lata*, 12: *Cryptovalsa ampelina*, 13: *Phaeomoniella chlamydospora*, 14: *Phaeoacremonium aleophilum*, 15: *Phomopsis viticola*, 16: *Stereum hirsutum* y 17: *Cylindrocarpon* sp.). Columna 18: Extracto de una planta *in vitro* de vid var. Garnacha tinta. Columna 19: Control negativo. Marcador de peso molecular de Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EE.UU.).

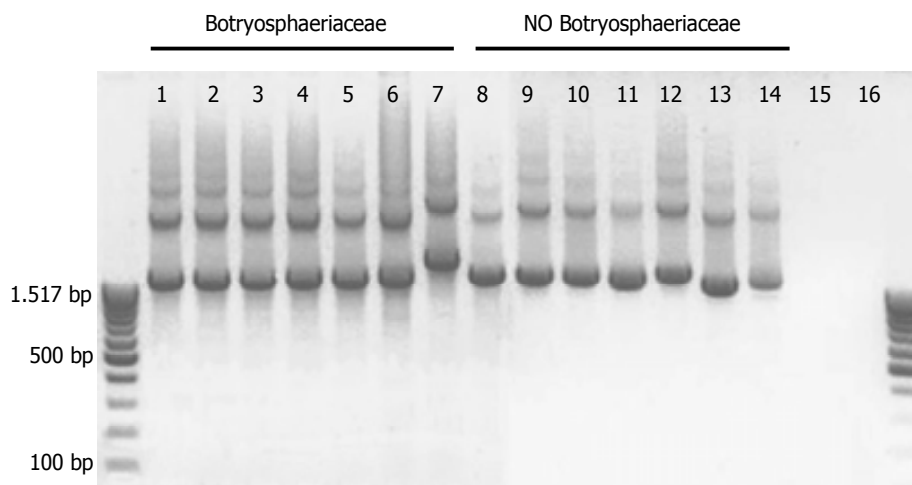


Figura 2.11 Productos amplificados mediante Co-PCR. Columnas 1-7: Especies de Botryosphaeriaceae (1: *Diplodia mutila*, 2: *Neofusicoccum parvum*, 3: *Neofusicoccum luteum*, 4: *Diplodia seriata*, 5: *Neofusicoccum vitifusiforme*, 6: *Botryosphaeria dothidea* y 7: *Dothiorella viticola*). Columnas 8-14: Especies no Botryosphaeriaceae (8: *Fomitiporia mediterranea*, 9: *Eutypa lata*, 10: *Phaeomoniella chlamydospora*, 11: *Phaeoacremonium aleophilum*, 12: *Phomopsis viticola*, 13: *Stereum hirsutum* y 14: *Cylindrocarpon* sp.). Columna 15: Extracto de una planta *in vitro* de vid var. Garnacha tinta. Columna 16: Control negativo. Marcador de peso molecular de Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EE.UU.).

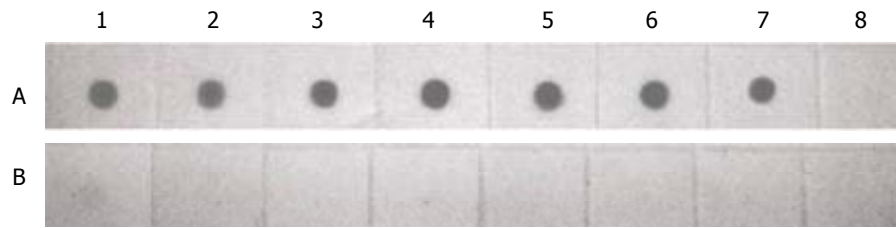


Figura 2.12 Detección de los amplicones hibridados con la sonda específica de Botryosphaeriaceae *Bot* (A1-A7) (A1: *Diplodia mutila*, A2: *Neofusicoccum parvum*, A3: *Neofusicoccum luteum*, A4: *Diplodia seriata*, A5: *Neofusicoccum vitifusiforme*, A6: *Botryosphaeria dothidea* y A7: *Dothiorella viticola*). Especies no Botryosphaeriaceae (A8-B7) (A8: *Fomitiporia mediterranea*, B1: *Eutypa lata*, B2: *Phaeoconiella chlamydospora*, B3: *Phaeoacremonium aleophilum*, B4: *Phomopsis viticola*, B5: *Stereum hirsutum* y B6: *Cylindrocarpon* sp.), extracto de una planta *in vitro* de vid var. Garnacha tinta (B7) y control negativo (B8).

Las concentraciones de ADN de los dos extractos analizados *Di. seriata* JL395 y *N. parvum* JL499 fueron de 64 ng/μl y de 372 ng/μl respectivamente. La detectabilidad de *Di. seriata* se realizó hasta la séptima dilución mientras que *N. parvum* se detectó hasta la octava (Figura 2.13). La sensibilidad de técnica se estableció para concentraciones de ADN en el rango de 3 a 6 x 10⁻⁶ ng/μl.

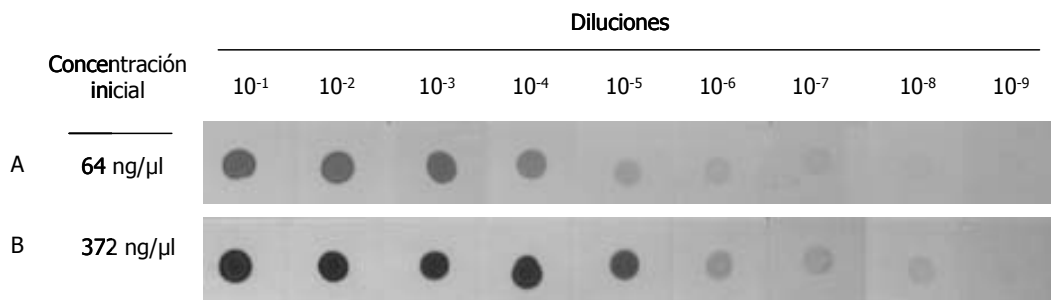


Figura 2.13 Detección de los amplicones de la PCR-cooperativa hibridados con la sonda específica *Bot* en diluciones sucesivas (10⁻¹-10⁻⁹) de los extractos de ADN de *Diplodia seriata* JL395 (fila A) y *Neofusicoccum parvum* JL499 (fila B).

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Identificación de Botryosphaeriaceae

Cinco de las siete especies de Botryosphaeriaceae estudiadas pudieron ser identificadas de manera inequívoca combinando la información extraída de los caracteres de los anamorfos y de las características de la colonia, en concreto *Di. mutila*, *Di. seriata*, *Do. viticola*, *N. luteum* y *N. parvum*. La forma y el tamaño de los conidios fue similar en *B. dothidea* y *N. vitifusiforme*, de modo que el solapamiento observado en las medidas no permitió una diferenciación clara de ambas especies. Los conidios de *B. dothidea* alcanzaron medidas de longitud y anchura mayores que los de *N. vitifusiforme*, aunque la diferencia entre la ratio L/A de ambas especies fue reducida en nuestras observaciones, 4,55 y 4,37, respectivamente. En las descripciones respectivas de estas especies, las diferencias en la ratio aparecen mucho más marcadas, 5,3 para *B. dothidea* (Phillips 2002) y 3,3 para *N. vitifusiforme* (Van Niekerk et al. 2004). Si bien, es preciso señalar que las medidas de *N. vitifusiforme* de nuestro estudio están basadas en el único aislado de la especie encontrado en Cataluña. Esto hace que las diferencias presentadas entre estas dos especies en la clave taxonómica no sean generalizables a otros aislados. Un posible criterio taxonómico para diferenciar *Neofusicoccum* de *Fusicoccum* es la presencia del sinanamorfo *Dichomera* en *Neofusicoccum* (Crous et al. 2006). Sin embargo, no todos los aislados de *Neofusicoccum* forman conidios tipo *Dichomera* en cultivo (Barber et al. 2005) lo que invalida el uso de este criterio en la clave dicotómica presentada en nuestro estudio. En la descripción de *N. vitifusiforme*, Van Niekerk et al (2004) comentaron la semejanza que presentaba esta especie con *N. luteum*, si bien el pigmento amarillo que forma *N. luteum* las hace distinguibles. Por otro lado, *N. luteum* y *N. parvum* se diferencian claramente entre sí y del dúo *dothidea/vitifusiforme* por el tamaño de sus conidios. Esta relación de tamaños, *B. dothidea* > *N. luteum* > *N. parvum*, se mantiene en aislados procedentes de vides de Portugal (Phillips 2002) y de kiwi de Nueva Zelanda (Pennycook y Samuels 1985).

Dothiorella viticola y *Di. seriata* se diferencian de las otras especies por la pigmentación marronosa de sus conidios. Estas dos especies difieren entre sí por la septación y

el momento en que se produce la coloración y septación de estas estructuras. *Dothiorella viticola* presenta conidios septados y coloreados desde estadíos iniciales del desarrollo, incluso cuando todavía están unidos a la célula conidiógena, mientras que los conidios de *Di. seriata* son aseptados y se colorean en la madurez. La tercera especie con conidios de extremos redondeados es *Di. mutila*, que se diferencia de *Di. seriata* por poseer conidios hialinos de ancho y largo superior, característica ya citada por Phillips (2002).

El 99% de los aislados de Botryosphaeriaceae procedentes del material de campo se obtuvieron en forma anamórfica, lo que constata la escasez de teleomorfos en la naturaleza (Shoemaker 1964). En tan sólo dos ocasiones se encontraron los teleomorfos de *Do. viticola* y de *N. parvum*. Las ascósporas de ambas especies son distinguibles entre sí debido a la particular morfología de las esporas del género *Dothidotthia*, oscuras y septadas (Luque et al. 2005). Esto no es lo habitual dentro de la familia Botryosphaeriaceae, cuyos integrantes suelen presentar ascósporas hialinas y aseptadas, con caracteres poco variables entre especies (Shoemaker 1964; Slippers et al. 2004b).

La observación de las colonias en placa reveló, en algunos casos, caracteres útiles para la identificación. Sin embargo, según el Dr. Alan Phillips (com. pers.), estos caracteres no tendrían validez taxonómica por no ser constantes. El ejemplo más claro de la variabilidad de estos caracteres fue la aparición de un pigmento rosado en un solo aislado de *Do. viticola*, no observado en los otros dos aislados de la especie. Las peculiaridades de la colonia sólo permitieron la identificación fiable de *N. luteum* debido al pigmento amarillento que libera en el medio, ya citado anteriormente (Pennycook y Samuels 1985) y considerado de valor taxonómico por Phillips et al. (2002).

Todos los aislados estudiados presentaron un patrón muy similar de crecimiento en placa en los tres medios de cultivo ensayados. Las especies que presentaron un mayor crecimiento fueron *N. parvum* y *N. luteum*. Este mayor crecimiento ya fue descrito en aislados de estos hongos procedente de kiwi (Pennycook y Samuels 1985). Se han observado algunas

diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por Úrbez-Torres et al. (2006); para estos autores, *N. luteum* mostró uno de los crecimientos más reducidos entre todas las especies de Botryosphaeriaceae estudiadas. A la máxima temperatura testada, 35° C, las dos únicas especies que presentaron crecimiento fueron *B. dothidea* y *N. vitifusiforme*. El crecimiento a altas temperaturas es otro carácter compartido por estas dos especies. El desarrollo a altas temperaturas de *B. dothidea* también había sido citado por Pennycook y Samuels (1985) y Sánchez-Hernández et al. (2002). Úrbez-Torres et al. (2006) registraron el óptimo de crecimiento de esta especie, junto con *L. theobromae*, a 30,8° C, el más alto de los siete aislados de Botryosphaeriaceae estudiados por los autores. Sin embargo, este carácter no parece constante en la especie; Jacobs y Rehner (1998) no registraron crecimiento a 35° C en aislados de *B. dothidea* de diferentes hospedadores y Brooks y Ferrin (1994) tampoco encontraron desarrollo en aislados de *B. dothidea* procedentes de 50 especies de arbustos californianos. La temperatura óptima para la mayoría de las especies estuvo entre los 25 y 30° C y su crecimiento fue reducido a bajas temperaturas. La excepción a este comportamiento general lo presentó *Do. viticola*, con un crecimiento óptimo a 20° C y un desarrollo por encima de la media a 10 y 15° C. Para esta especie, Van Niekerk et al. (2004) registraron un crecimiento mínimo a 10° C, máximo a 30° C y óptimo a 25° C.

En los últimos años se ha generalizado el uso de técnicas moleculares en la identificación y clasificación de las especies de Botryosphaeriaceae. Estas herramientas nos han permitido diferenciar a las seis especies de Botryosphaeriaceae aisladas en Cataluña junto con *Di. mutila*. En un primer momento, los árboles filogenéticos del grupo se construían en base a las regiones ITS del ADN ribosómico (Denman et al. 2000; Zhou y Stanosz 2001) pero en un intento de resolver algunas de las ambigüedades generadas y dar cabida a nuevas especies, se amplió el estudio a otras regiones como la del factor de elongación (EF1- α) (Van Niekerk et al. 2004; Luque et al. 2005) y la de la β -tubulina (Slippers et al. 2004b; Úrbez-Torres et al. 2006). En las filogenias basadas tanto en una región como en la combinación de varias regiones, se reconocen los géneros de anamorfos *Fusicoccum*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Dothiorella*, dentro de la familia Botryosphaeriaceae (Van Niekerk et al. 2004; Luque et al. 2005; Phillips et al.

2005; Crous et al. 2006). En el presente estudio, no fue posible combinar los datos de las tres regiones para crear una única filogenia combinada y, por tanto, cada región tuvo que ser analizada de forma aislada. Si bien, los grandes clados de *Fusicoccum* y *Diplodia* resultaron bien definidos en los tres árboles, las dos especies de *Dothiorella* sólo quedaron agrupadas en la filogenia de EF1- α . Sin embargo en el árbol del factor de elongación, *Dothiorella* apareció como un clado independiente de *Fusicoccum* y *Diplodia* mientras que en las filogenias previas, *Dothiorella* aparecía más próximo a *Fusicoccum* (Luque et al. 2005; Phillips et al. 2005).

El estudio de Crous et al. (2006) ha generado importantes cambios en la nomenclatura y en las relaciones filogenéticas de las especies de Botryosphaeriaceae. Analizando las secuencias de la región 28S del ADN ribosómico, Crous et al. (2006) obtuvieron 11 clados con anamorfos en Botryosphaeriaceae. Sin embargo, la nomenclatura de los géneros teleomórficos de esta familia aún permanece confusa e incompleta ya que esta cuestión no fue abordada por Crous et al. (2006). Según estos autores, las especies analizadas en nuestro estudio quedan englobadas en cuatro clados: Clado 1: *Diplodia/Lasiodiplodia* (diversos géneros teleomórficos posibles), Clado 2: *Botryosphaeria* (anamorfo *Fusicoccum*), Clado 5: *Dothidotthia* (anamorfo *Dothiorella*) y Clado 6: *Neofusicoccum* (teleomorfo tipo *Botryosphaeria*) y que supone un nuevo género anamórfico. El análisis filogenético realizado en dos grupos independientes (*Diplodia/Lasiodiplodia* y *Fusicoccum/Neofusicoccum/Dothiorella*) confirma las filogenias obtenidas previamente en otros estudios (Luque et al. 2005; Phillips et al. 2005; Crous et al. 2006; Slippers et al. 2007).

Los numerosos estudios que se han realizado sobre la familia Botryosphaeriaceae, combinando morfología y datos de varias regiones moleculares, han permitido la segregación de especies que anteriormente parecían una única. Pennycook y Samuels (1985) reconocieron diferencias apreciables en la forma y tamaño de los conidios, la virulencia y la sensibilidad a fungicidas de aislados catalogados como *B. dothidea*. Basándose en estas diferencias, los autores describieron dos nuevas especies *N. parvum* y *N. luteum*, que aparecen claramente diferenciadas en los posteriores estudios moleculares y filogenéticos. Con la información

integrada de las regiones ITS, EF y β -tubulina se aprecia la segregación de *N. ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *N. parvum* (Slippers et al. 2004b) y de *N. luteum* y *N. australe* (Slippers et al. 2004c). En nuestra filogenia, a pesar de haber empleado las tres regiones moleculares, *N. australe* y *N. luteum* quedaron agrupadas en un mismo clado. Slippers et al. (2004c) afirmaron que, aunque las diferencias eran constantes, tan sólo variaban unos cuantos pares de bases en cada región, lo que probablemente en nuestro caso fue insuficiente para separarlas. *Neofusicoccum vitifusiforme* y *B. dothidea*, cuya identificación morfológica quedaba algo ambigua, quedaron claramente diferenciadas a partir de los datos moleculares. *Neofusicoccum vitifusiforme* se encuentra más próximo filogenéticamente a *N. luteum*/*N. australe* que a *B. dothidea*, y la ausencia de pigmento amarillo permite diferenciarlo morfológicamente de los dos primeros. La información molecular ha puesto de manifiesto la variabilidad genética de *Di. mutila*, al sugerir la existencia de dos clados; por un lado, los aislados procedentes de vid y, por el otro, los procedentes de otros hospedadores.

En estudios filogenéticos previos se han empleado diferentes especies de ascomicetos como grupo externo de Botryosphaeriaceae, entre otras: *Cercospora* Fresen (Orden *Capnodiales*) (Van Niekerk et al. 2004), *Bionectria* (Orden *Hypocreales*) (Luque et al. 2005), especies de la familia Magnaporthaceae (Crous et al. 2006) y *Guignardia philoпрina* (Berk. & M.A. Curtis) Aa, de la propia familia Botryosphaeriaceae (Slippers et al. 2004b). En el presente estudio se utilizó el aislado CMW7063 de una especie de *Hypocreales* que ya había sido empleado por otros autores (Luque et al. 2005). Si bien esta especie está algo alejada de Botryosphaeriaceae, se escogió este aislado por ser el único con secuencias de las tres regiones disponibles en GenBank. Sin embargo, es posible que la elección de esta especie como *outgroup* haya dado lugar a las filogenias incongruentes (Dr. Alan Phillips com. pers.).

2.4.2 Nueva técnica de detección específica para Botryosphaeriaceae

El diagnóstico rápido de las enfermedades de madera en vides adultas y la posibilidad de certificar plantas de vivero libres de estas patologías son algunos de los grandes retos que puede ayudar a resolver la biología molecular. El empleo de un método de detección

rutinario de gran sensibilidad y bajo coste permitiría procesar un gran número de muestras y detectaría de forma precoz el material infectado. El procedimiento aplicado en este trabajo (PCR-cooperativa acoplado al revelado colorimétrico mediante hibridación *dot blot*) reúne todos los requisitos para ser empleado como método rutinario de detección. Esta técnica ya se ha aplicado de forma exitosa en la identificación de material vegetal infectado con alguno de los virus de ARN más conocidos en fitopatología (CLRV, virus del enrollado de la hoja del cerezo, SLRSV, virus latente de la mancha anular de la fresa, CMV, virus del mosaico del pepino, PPV, virus de la "sharka" y CTV, virus de la tristeza de los cítricos) (Olmos et al. 2002). También se ha aplicado en la detección de fitoplasmas en *Malus domestica* Borkh., *Pyrus communis* L. y diversas especies de *Prunus* L. (Bertolini et al. 2007). La técnica ha mostrado además mayor sensibilidad que otros métodos para detectar en agua de riego la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, causante de importantes daños en cultivos de patata (Caruso et al. 2003). Torres et al. (2006) presentaron resultados preliminares prometedores de la aplicación de esta técnica en la detección de *Phaeoconiella chlamydospora*, hongo patógeno de madera de vid.

En el análisis de las secuencias para el diseño de la sonda específica de hibridación, se encontró una región de 18 pares de bases común a las nueve especies de Botryosphaeriaceae analizadas y ausente en el resto de especies asociadas a enfermedades de la viña. El empleo de esta región como diana de un iniciador específico consiguió amplificar de forma exclusiva los nueve aislados de Botryosphaeriaceae, lo que confirma empíricamente la especificidad de la región hallada para la detección de estas especies en conjunto. En la bibliografía se menciona la existencia de una región específica en especies con anamorfos tipo *Fusicoccum* (Slippers et al. 2004a). Sin embargo, no hay referencia de la existencia de una zona específica para toda la familia que permita diferenciar molecularmente a las especies de Botryosphaeriaceae de otros hongos patógenos de madera de la vid. Los avances en la identificación molecular de Botryosphaeriaceae han ido hasta ahora más encaminados hacia la caracterización de las especies. El método ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*), basado en la digestión de un amplicón de ADN ribosómico con endonucleasas de

restricción de corte frecuente (Guarro et al. 1999; Olive y Bean 1999), ofrece un patrón específico que permite diferenciar entre diez especies de Botryosphaeriaceae (Alves et al. 2005). Sin embargo, en este trabajo no aparecen todas las especies presentes en vid, faltan *Do. viticola* y *N. vitifusiforme*, que, junto con las diez restantes, sí se han incluido en nuestro trabajo. Alves et al. (2007) aplicaron de forma satisfactoria dos métodos de *fingerprinting* para la identificación interespecífica de la familia, que mostraron patrones específicos de bandas para 27 especies. Estos métodos analizan todo el genoma y detectan de forma clara la variabilidad intra- e interespecífica, basándose en la aparición de secuencias repetitivas presentes en el genoma de los eucariotas (Olive y Bean 1999; Soll 2000). La sensibilidad de estas técnicas es tan alta que incluso se resaltan las diferencias entre aislados de una misma especie. Por tanto, la aplicación podría estar dirigida más hacia el estudio de estructuras poblacionales y de variabilidad genética que hacia la estandarización como método de identificación rápido.

La detección colorimétrica, hibridación con sonda marcada y reacción de cambio de color, aunque requieren más tiempo y manipulación que el revelado mediante tinción con bromuro de etidio, facilita enormemente la interpretación de los resultados (Olmos et al. 2002). Con el revelado colorimétrico se evita el uso del bromuro de etidio, conocido por ser mutagénico, y permite analizar una gran cantidad de muestras (Bertolini et al. 2001). La sensibilidad de detección de la técnica se estableció en 10^{-6} ng/ μ l, resultado comparable al obtenido por Torres et al. (2006) en la detección de *Pa. chlamydospora*. Torres et al. (2006) observaron que esta técnica mejoraba en 100 veces la capacidad de detección en relación con el revelado en gel de agarosa, y que la técnica de Co-PCR lo hacía, a su vez 100 veces más, con respecto a la PCR directa con la pareja de primers externos NSA3-NLC2.

Los resultados positivos de especificidad que ha mostrado la sonda *Bot* diseñada deberán validarse en madera infectada de forma artificial con los diferentes patógenos. Una vez comprobada la detectabilidad en material vegetal, se podrá emplear la técnica en la detección rutinaria del grupo de Botryosphaeriaceae en muestras de campo. Olmos et al. (2002) ya han reconocido la versatilidad del método para trabajar con diferentes materiales vegetales

infectados, lo que valida su uso para la diagnosis de diversos fitopatógenos. Otra de las ventajas es que la sensibilidad del proceso permite detectar el patógeno a concentraciones muy bajas, cuando no aparecen síntomas en planta. Si se aplicara este método de forma generalizada podría ser posible la detección rápida simultánea de todos los patógenos implicados en el decaimiento de la vid mediante la creación de sondas específicas para cada uno de ellos.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I. y Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters* 245, 221-229.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I. y Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158, 112-121.
- Barber, P. A., Burgess, T. J., Hardy, G. E. S. J., Slippers, B., Keane, P. J. y Wingfield, M. J. (2005). *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. *Mycological Research* 109, 1347-1363.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M. C., Gorris, M. T. y Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods* 96, 33-41.
- Bertolini, E., Torres, E., Olmos, A., Martín, M. P., Bertaccini, A. y Cambra, M. (2007). Co-operational PCR coupled with dot blot hybridization for detection and 16SrX grouping of phytoplasmas. *Plant Pathology* 56, 677-682.
- Brooks, F. E. y Ferrin, D. M. (1994). Branch dieback of Southern California chaparral vegetation. *Phytopathology* 84, 78-83.
- Butin, H. (1993). Morphological adaptation and spore pleomorphism in the form-complex *Dichorema-Camarosporium* and *Fusicoccum-Dothiorella*. *Sydowia* 45, 161-166.
- Carbone, I., Anderson J. B. y Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553-556.
- Caruso, P., Bertolini, E., Cambra, M. y López, M. M. (2003). A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *Journal of Microbiological Methods* 55, 257-272.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. y Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55, 235-253.
- De Wet, J., Burgess, T., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2003). Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* 107, 557-566.
- Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J. C., Pascoe, I. y Wingfield, M. J. (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.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR-Methods and Applications* 3, S30-S37.

2 Bibliografía

- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. y Bult, C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Glass, N. L. y Donaldson G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Guarro, J., Gené, J. y Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 454-500.
- Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hillis, D. M. y Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42, 182-192.
- Jacobs, K. A. y Rehner, S. A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90, 601-610.
- Laundon, G. (1973). *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spirae* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society* 61, 368-374.
- Luque, J., Martos, S. y Phillips, A. J. L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111-1121.
- Martin, F., Costa, G., Dalaruelle, C. y Diez, J. (1998). Genomic Fingerprinting of Ectomycorrhizal Fungi by Microsatellite-Primed PCR. In: Varma, A. (ed.). *Mycorrhiza Manual*. Springer Lab Manual. Springer Berlin Heidelberg. pp. 463-474.
- Martin, K. J. y Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/28>.
- Olive, D. M. y Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1661-1669.
- Olmos, A., Bertolini, E. y Cambra, M. (2002). Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 106, 51-59.
- Pennycook, S. R. y Samuels, G. J. (1985). *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24, 445-458.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Phillips, A., Alves, A., Correia, A. y Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97, 513-529.
- Phillips, A. J. L., Fonseca, F., Pova, V., Castilho, R. y Nolasco, G. (2002). A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54, 59-77.
- Sánchez-Hernández, M. E., Gutiérrez-García, J. y Trapero-Casas, A. (2002). *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathology* 51, 365-373.
- Shoemaker, R. A. (1964). Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42, 1297-1303.
- Slippers, B., Burgess, T., Wingfield, B. D., Crous, P. W., Coutinho, T. A. y Wingfield, M. J. (2004a). Development of simple sequence repeat markers for *Botryosphaeria* spp. with *Fusicoccum* anamorphs. *Molecular Ecology Notes* 4, 675-677.
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2004b). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83-101.
- Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2004c). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96, 1030-1041.

- Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56, 128-139.
- Soll, D. R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 332-370.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Torres, E., El Bakali, M. A., Luque, J., Martos, S., Raposo, R., Aroca, A. y García, F. (2006). Detección específica y sensible de *Phaeoconiella chlamydospora* mediante PCR cooperativa. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, pp. 200. 18-22 de Septiembre de 2006 (Murcia).
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. y Gubler, W. D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490-1503.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald J. Z., Fourie, P. H. y Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.
- White, T. J., Bruns T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Snisky, J. J. y White, T. J. (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press. pp. 315-322.

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS FITOTÓXICOS DE CINCO ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE

3.1	INTRODUCCIÓN	90
3.2	MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.2.1	Condiciones de cultivo de las especies fúngicas	91
3.2.2	Procedimientos químicos generales.....	92
3.2.3	Separación de las fases acuosa y orgánica de los filtrados del cultivo.....	93
3.2.4	Análisis de la fase acuosa	93
3.2.5	Análisis de la fase orgánica	94
3.2.6	Pruebas de fitotoxicidad	95
3.3	RESULTADOS	96
3.4	DISCUSIÓN	104
3.5	BIBLIOGRAFÍA	107

RESUMEN

Se estudió la capacidad de cinco especies de Botryosphaeriaceae de producir toxinas en cultivo líquido. Las especies estudiadas fueron *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*. Se ajustaron las condiciones óptimas de cultivo para obtener en cada caso la producción de sustratos con la máxima capacidad fitotóxica. Para ello, los aislados se cultivaron en medio de cultivo Czapek-Dox a diferentes periodos de incubación. La fitotoxicidad de *Di. seriata* y *N. parvum* alcanzó un máximo tras 14 días en cultivo mientras que el resto de especies necesitó 21 días. Todos los hongos produjeron compuestos hidrofílicos de elevado peso molecular con propiedades fitotóxicas. Los filtrados del cultivo de *N. luteum* y *N. parvum* y sus respectivos extractos orgánico y acuoso mostraron de forma reiterada ser altamente fitotóxicos en los diferentes ensayos realizados. La cromatografía de gases de los glicósidos obtenidos a partir de los exopolisacáridos fitotóxicos de *N. parvum* mostró que estas sustancias están compuestas principalmente por glucosa, manosa y galactosa. Estos monómeros son diferentes a los del botryosfaerano, exopolisacárido aislado de *Lasiodiplodia theobromae*. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* produjeron también fitotoxinas lipofílicas de bajo peso molecular, compuestos que no fueron detectados en el resto de especies.

3.1 INTRODUCCIÓN

Se conocen numerosos hongos patógenos capaces de producir toxinas, tanto en las plantas que infectan como en el medio de cultivo en el que crecen. Estas sustancias nocivas se caracterizan por ser muy efectivas a baja concentración y son capaces de dañar las membranas celulares, afectar al transporte de sustancias y/o inactivar, inhibir o interrumpir las reacciones enzimáticas del huésped vegetal (Tabacchi et al. 2000). Comúnmente causan necrosis, clorosis, marchitamiento y podredumbre, pudiendo provocar, en ocasiones, incluso la muerte de la planta (Amusa 2006).

A día de hoy se han descrito una serie de metabolitos fitotóxicos producidos por diferentes hongos causantes de decaimiento en vid. Un ejemplo son la escitalona y la isosclerona, dos pentaquetidos derivados de la naftalenona, aislados del filtrado del cultivo de *Phaeoacremonium aleophilum* (Evidente et al. 2000). Otras fitotoxinas identificadas, producidas por el agente causal de la eutipiosis en viña (*Eutypa lata*), son eutipina, eutipinol, metil-eutipinol, eulatacromeno, 2-iso-propenil-5-formilbenzofurano y eulatinol (Fallot et al. 1997; Mahoney et al. 2005; Lardner et al. 2006). Tabacchi et al. (2000) identificaron además otros metabolitos fitotóxicos en el filtrado del cultivo líquido de los cuatro hongos relacionados con la yesca, *Fomitiporia mediterranea* (4-hidroxibenzilaldehído y 6-formil-2,2-dimetil-4-cromanona), *Pm. aleophilum* (4-hidroxibenzilaldehído), *Phaeomoniella chlamydospora* (4-hidroxibenzilaldehído y 3-(3-metil-but-2-enilo)-4-hidroxibenzilaldehído)-ácido-benzoico) y *Stereum hirsutum* (esterehirsutinal). El estudio de la estructura química de las toxinas de naturaleza orgánica de estos cuatro hongos, junto con las de *E. lata*, pareció identificar un posible precursor común a todas ellas, el 4-hidroxibenzilaldehído. Este hecho podría revelar la importancia de los derivados de esta sustancia en la toxicidad de dichos hongos (Tabacchi et al. 2000). Además, del cultivo de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* se aisló una mezcla de exopolisacáridos (α -glucanos), de diferente peso molecular, que también mostró una importante capacidad fitotóxica (Sparapano et al. 2000). Según Perrin-Cherieux et al. (2004), la actividad de varias fitotoxinas producidas por distintos patógenos podría generar un efecto

sinérgico entre ellas, y estar directamente relacionado con la expresión de los síntomas de las enfermedades.

El género *Botryosphaeria* y las especies relacionadas también son conocidos por producir metabolitos fitotóxicos, aunque estas sustancias se han estudiado en aislados no procedentes de viña (Venkatasubbaiah y Chilton 1990; Venkatasubbaiah et al. 1991). La falta de datos sobre los metabolitos fitotóxicos generados por especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vid impide conocer bien el papel patogénico de estas especies. Por tanto, el objetivo planteado fue el de evaluar la fitotoxicidad de metabolitos producidos por especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vides afectadas de decaimiento. En este estudio también se trabajó en la optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* para la producción de toxinas por parte de estas especies, así como en la caracterización biológica y química de estos metabolitos tóxicos.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Condiciones de cultivo de las especies fúngicas

Los cinco aislados empleados proceden de viñas afectadas de enfermedades de madera localizadas en Cataluña (Tabla Anexo 2). Se depositó un cultivo representativo de cada uno de estos aislados en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda). Los aislados se cultivaron en frascos Roux de 1 l que contenían 150 ml de medio de cultivo Czapeck-Dox (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, EE.UU.), enriquecido con 0,5% de extracto de levadura y 0,5% de extracto de malta. Para iniciar los cultivos se añadieron a este medio fragmentos de micelio (10 a 15) procedentes de una colonia de una semana de edad cultivada sobre PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.). Los cultivos se incubaron a 25° C y oscuridad durante 7, 14 y 21 días para determinar el periodo de incubación óptimo para cada hongo, aquél en el que se alcanzase la máxima toxicidad. Transcurridos los periodos respectivos para cada especie, se filtraron los cultivos a través de un papel de filtro cuádruple para eliminar la masa de micelio y se almacenaron a -20° C hasta su procesamiento. La fitotoxicidad de los filtrados del cultivo se ensayó sobre plantas de tabaco

como se explica más adelante. Los periodos óptimos de incubación que se establecieron para cada especie se siguieron en los ensayos de fitotoxicidad posteriores y en el estudio químico de las toxinas.

3.2.2 Procedimientos químicos generales

Las cromatografías analíticas de capa fina (TLC) se llevaron a cabo sobre placas de gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm (Merck, Darmstadt, Alemania), utilizando como eluentes cloroformo:isopropanol (8:2 ó 9:1, v/v) y acetato de etilo:n-hexano (6:4, v/v). Las placas de sílice se puntearon en su base con las diferentes sustancias a analizar mediante un capilar hasta formar un punto de aproximadamente 4 mm de diámetro. Las placas se introdujeron en cubetas, con el eluyente bañando ligeramente la base, y se extrajeron antes de que el frente alcanzase el límite superior de la placa. Los compuestos separados por polaridad a lo largo de la TLC se visualizaron con diferentes técnicas: 1) exposición a la luz UV (254 ó 360 nm); 2) pulverizado con H₂SO₄ (10% disuelto en metanol), posteriormente con ácido fosfomolibdico (5% disuelto en etanol) y calentadas a 110° C durante 10 min; 3) pulverizado con ninhidrina (0,5% disuelta en acetona) y calentadas a 110° C durante 10 min y 4) exposición de las placas a vapores de yodo.

Se llevaron a cabo diálisis de los filtrados de los cultivos de las cinco especies, así como en el proceso de extracción de exopolisacáridos de *N. luteum* y *N. parvum*. Las diálisis se realizaron en membranas porosas tubulares Spectra/Por de corte molecular 3500 Da (Spectrum Medical Industries Inc., Houston, Texas, EE.UU.). Se sumergieron las membranas en agua destilada y se mantuvieron a 10° C durante 48 h, renovando el agua cada 8 h, aproximadamente.

Las cromatografías se realizaron en columnas de vidrio de 80 cm longitud y 4 cm diámetro, empleando como fase estacionaria gel de sílice Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm, (Merck, Darmstadt, Alemania) y como fase móvil cloroformo:isopropanol (8:2, v/v).

3.2.3 Separación de las fases acuosa y orgánica de los filtrados del cultivo

Las extracciones se realizaron a tres pH diferentes: 1) pH del propio filtrado del cultivo, 2) pH 2 mediante acidificación con ácido fórmico 1M y 3) pH 10 mediante alcalinización con amoníaco 1M. De cada aislado, se tomaron tres muestras de 20 ml del filtrado y se modificó el pH de las muestras siguiendo el procedimiento anterior. La fase orgánica del filtrado se extrajo con 60 ml de acetato de etilo en tres extracciones consecutivas, de 20 ml cada una, y se combinaron aquéllas correspondientes al mismo pH. Para eliminar el exceso de agua se añadió Na_2SO_4 al combinado que posteriormente se filtró con papel del filtro. El residuo orgánico se recuperó al evaporar el acetato de etilo bajo presión reducida mediante un Rotavapor® R-125 (Büchi Labortechnik, Flawil, Suiza). Por su parte, la fase acuosa recuperada tras la extracción orgánica, se liofilizó previa congelación en un baño de metanol a -10°C . Finalmente, se comprobó la fitotoxicidad de los extractos orgánicos obtenidos para cada pH y aislado, y sus correspondientes fases acuosas siguiendo el procedimiento explicado más adelante.

3.2.4 Análisis de la fase acuosa

a) *Diálisis de los filtrados del cultivo*

Se mezclaron muestras (3 ml) del cultivo líquido de cada aislado con 3 ml de agua ultrapura Milli-Q y se dializaron. Las membranas se sumergieron en 10 ml de agua destilada y transcurridas 48 h, se recuperó y liofilizó el contenido de las membranas (IN) y de las diversas fracciones externas (OUT) para posteriores análisis fitotóxicos.

b) *Obtención de los exopolisacáridos de Neofusicoccum luteum y N. parvum*

La obtención de los polisacáridos extracelulares (EPS) presentes en el filtrado de los cultivos de *N. luteum* y *N. parvum* se realizó fraccionando la fase acuosa de la extracción ácida con etanol frío. Se disolvió el residuo liofilizado de la fase acuosa en 80 ml de agua ultrapura Milli-Q y se enfrió a 4°C . Una vez enfriada la mezcla, se combinó con 4 volúmenes de etanol absoluto (320 ml) a 4°C y se mantuvo toda la noche a -20°C . El precipitado obtenido

se separó mediante centrifugación en frío a 7000 rpm durante 45 min. La fase etanólica se evaporó bajo presión reducida y se obtuvo una sustancia aceitosa de textura viscosa y homogénea. El precipitado obtenido se volvió a disolver en agua ultrapura Milli-Q (70 ml) y se precipitó de nuevo con 280 ml de etanol absoluto frío como ya se ha descrito. Este segundo precipitado se disolvió en 50 ml de agua ultrapura y se dializó según lo descrito anteriormente. Para finalizar, se comprobó la fitotoxicidad de todas las fracciones obtenidas durante el proceso de precipitación (fase IN de la diálisis de los EPS, fases OUT y fracciones etanólicas).

c) *Análisis de los exopolisacáridos de Neofusicoccum parvum*

Para conocer los azúcares presentes en el filtrado del cultivo de *N. parvum* se realizó una metanólisis de los exopolisacáridos obtenidos. La metanólisis de una pequeña muestra (200-500 µg) de EPS se llevó a cabo con metanol/ácido clorhídrico 1M a 85° C durante 18 h. Los O-metil glicósidos resultantes se acetilaron con anhídrido acético y piridina a 85° C y 30 min. Los glicósidos acetilados se extrajeron mediante CHCl₃/H₂O y se analizaron con un cromatógrafo de gases con detector de masas GC-MS Agilent 5973 (Santa Clara, California, EE.UU.). El detector de masas GC-MS se dotó de una columna capilar SPB-5 (Supelco, 30 m longitud x 0,25 mm diámetro y 0,8 mL/min flujo de helio). El programa de temperatura empleado fue el siguiente: 150° C (5 min), 150 → 300° C a 5° C/min, 300° C (15 min). Para el espectro de masas se empleó una energía de ionización de 70 eV y una corriente de 0,2 mA (Vinogradov et al. 1992; Holst 2000).

3.2.5 Análisis de la fase orgánica

a) *Cromatografía en columna de los extractos orgánicos de Neofusicoccum luteum y N. parvum*

Cada extracto orgánico ácido de estos aislados se fraccionó mediante cromatografía en fracciones de 7 ml con las que se prepararon TLC en el mismo eluyente (cloroformo:isopropanol, 8:2, v/v). Las fracciones que se mostraron homogéneas en las TLC se combinaron y evaporaron bajo presión reducida. Los compuestos más polares se recuperaron

en una fracción única mediante adición de 1 l de metanol en la columna que fue igualmente evaporado. Por último, se analizó la fitotoxicidad de los residuos de cada grupo homogéneo combinado y del residuo metanólico.

3.2.6 Pruebas de fitotoxicidad

a) *En planta de tabaco*

Este ensayo preliminar se realizó para evaluar la actividad fitotóxica de los filtrados del cultivo de las especies y determinar el periodo óptimo de incubación en el que se obtiene la máxima capacidad fitotóxica. Se realizaron infiltraciones de 500 µl del filtrado del cultivo de cada aislado en tres momentos del periodo de incubación (7, 14 y 21 días). Se seleccionaron al azar hojas asintomáticas de plantas de tabaco y se inyectó el filtrado en el mesófilo foliar con una jeringuilla de insulina. Se utilizaron como réplicas cuatro hojas por hongo y periodo de incubación y como controles medio de cultivo Czapeck-Dox y agua destilada aplicando el mismo procedimiento. La actividad fitotóxica se expresó como el porcentaje de hojas que mostraron lesiones necróticas en la zona infiltrada en un tiempo máximo de 48 h tras la infiltración.

b) *En hoja de vid*

La toxicidad del filtrado del cultivo de *N. parvum* también se probó en hojas maduras de *Vitis vinifera* var. Tempranillo, puesto que algunos estudios previos han confirmado que esta especie es una de las más virulentas sobre vid (Van Niekerk et al. 2004; datos no publicados del capítulo 4). El filtrado de este aislado se testó a cuatro diluciones diferentes (100, 50, 10 y 1%) utilizando agua destilada estéril como solvente. Se escogieron al azar hojas plenamente desarrolladas y asintomáticas, procedentes de plantas adultas, y se seccionaron por el pecíolo. Se sumergió el pecíolo de cada hoja en un vial que contenía 3 ml de la dilución del filtrado durante 20 h. Las hojas se transfirieron a un nuevo vial con agua destilada y se mantuvieron durante 28 h más, hasta el final del ensayo. Las hojas se conservaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad y a una temperatura de 28° C. Se emplearon como réplicas cinco hojas por cada concentración y como sustancias control medio de cultivo Czapeck-Dox y agua destilada. Al final del experimento, se examinaron

las hojas y se evaluaron los síntomas observados en una escala 0-3: 0) ausencia de síntomas, 1) ligero marchitamiento, 2) presencia de áreas necróticas y 3) necrosis severa de la superficie foliar. La actividad fitotóxica se calculó estandarizando el valor medio de las 5 hojas, en un rango de 0 a 100%.

c) *En plántula de tomate*

En plántulas de tomate se comprobó la fitotoxicidad de las siguientes sustancias: 1) para todos los aislados, la fase acuosa y el extracto orgánico a los 3 pH ensayados, 2) las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto orgánico ácido de *N. luteum* y *N. parvum* y 3) el precipitado de exopolisacáridos de la fase acuosa de *N. luteum* y *N. parvum*. Las muestras lipofílicas se diluyeron en 100 µl de metanol y se ajustaron a un volumen final de 6 ml con agua destilada y las muestras hidrofílicas se disolvieron directamente en 6 ml de agua destilada. El pH resultante de las diferentes diluciones se neutralizó (pH 7) con 1% NaOH (p/v) o bien 1% HCl (v/v). Se realizaron tres réplicas por sustancia a testar y para las sustancias control se empleó medio Czapeck-Dox (pH 6,7) y agua destilada. Se sumergió el tallo de una planta de tomate var. Incas con dos hojas verdaderas y sin raíz en 2 ml de solución. Las plantas se mantuvieron durante 12 h en solución y posteriormente se transfirieron a agua destilada durante 36 h más. El experimento se realizó en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad y a una temperatura de 28° C. Las lesiones mostradas por la planta se evaluaron al final del ensayo, tras 48 h, en una escala 0-4: 0) ausencia de síntomas, 1) ligero marchitamiento en una hoja, 2) puntos necróticos y marchitez en varias hojas, 3) marchitamiento severo en las hojas y 4) desecación completa de toda la planta. La actividad fitotóxica se calculó estandarizando el valor medio de las 3 plántulas, en un rango de 0 a 100%.

3.3 RESULTADOS

Los filtrados de los cultivos de todas las especies estudiadas mostraron actividad fitotóxica sobre hojas de tabaco, aunque hubo diferencias de toxicidad entre los diferentes

periodos de incubación. La toxicidad máxima de *Di. seriata* y *N. parvum* se alcanzó tras 14 días en cultivo, con un importante decrecimiento posterior, mientras que el resto de especies mostraron toxicidad únicamente a los 21 días (Figura 3.1). A partir de estos resultados se determinó el periodo de incubación óptimo para cada especie y se fijaron las condiciones de cultivo para el resto del ensayo. Las sustancias empleadas como control (medio Czapek-Dox y agua destilada) no mostraron lesión alguna en ninguno de los tiempos de incubación.

También se confirmó la toxicidad del filtrado de *N. parvum* sobre vid. Los filtrados del cultivo de 14 días causaron, en todas las hojas de vid ensayadas, desde decoloración y necrosis foliares hasta un total marchitamiento (Figura 3.2 y 3.3). La actividad tóxica se redujo conforme aumentaba el factor de dilución aunque la relación no fue lineal: los filtrados al 1% y 10% generaron una afección mucho mayor de lo esperado para su grado de dilución (Figura 3.3). Las hojas de vid inmersas en las sustancias control no mostraron ningún síntoma en su superficie (Figura 3.2).

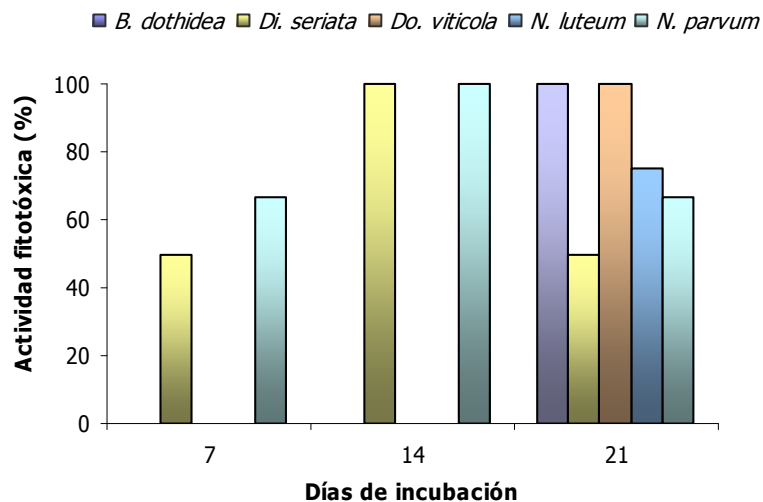


Figura 3.1 Actividad fitotóxica en hojas de tabaco de los filtrados del cultivo de cinco especies de Botryosphaeriaceae aisladas de viña a diferentes periodos de incubación. Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas.

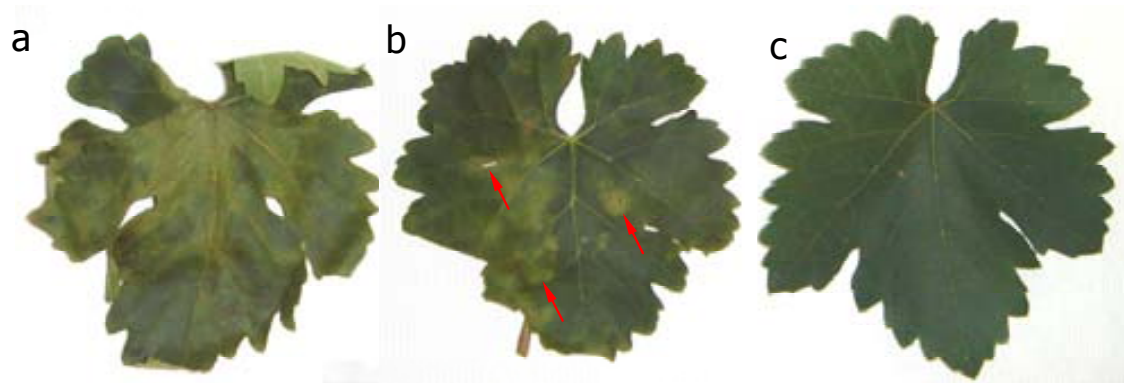


Figura 3.2 Síntomas causados por el filtrado del cultivo de *Neofusicoccum parvum* tras 14 días de incubación en hojas de vid var. Tempranillo: marchitamiento severo **(a)**, marchitamiento parcial con puntos necróticos (flechas) **(b)**, hoja asintomática (control inmerso en agua destilada) **(c)**.

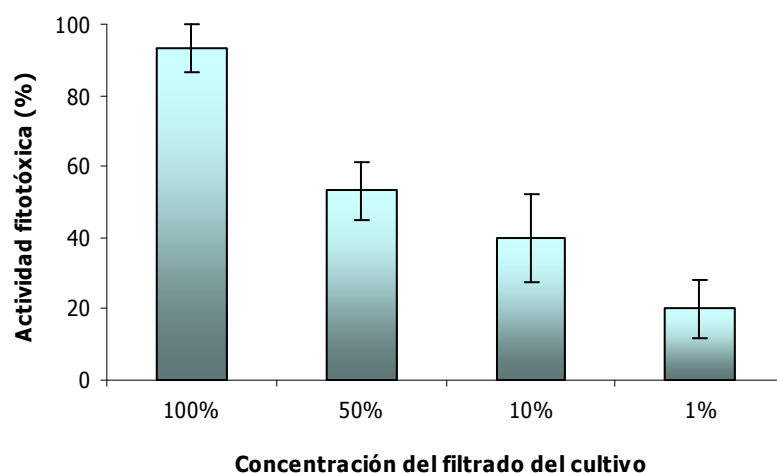


Figura 3.3 Actividad fitotóxica en hojas de vid del filtrado del cultivo de *Neofusicoccum parvum* tras 14 días de incubación y a diferentes concentraciones. Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas. Las barras de error indican el error estándar de la media.

La [Tabla 3.1](#) muestra la cantidad de productos presentes en las diferentes fases para las diferentes especies. En general, la fase acuosa presentó una cantidad de residuos mayor que la fase orgánica. Los residuos de la fase acuosa presentaron valores máximos en la extracción básica (pH 10) para todas las especies salvo para *B. dothidea*. La extracción orgánica a pH ácido proporcionó cantidades significativamente mayores de extracto que los otros dos pH ensayados. *Neofusicoccum luteum* fue el hongo que produjo la cantidad más alta de residuos

en, prácticamente, todas las fases y todos los pH ensayados. Por el contrario, *Di. seriata* mostró los valores menores de producción dentro de la fase orgánica mientras que *D. viticola* los mostró para la fase acuosa (Tabla 3.1).

La actividad fitotóxica más elevada se detectó en los extractos de la fase acuosa (Figura 3.4). Todas las especies mostraron actividad a pH 10 con un porcentaje variable entre el 88 y el 100%. A pH inferiores, la fitotoxicidad de *B. dothidea*, *Di. seriata*, y *Do. viticola* se vio reducida, mientras que la de *N. luteum* y *N. parvum* permaneció estable en torno al 90% de actividad. En la fase orgánica, la mayor fitotoxicidad se registró a pH 2 para los extractos de *N. luteum* y *N. parvum*. Estos valores de toxicidad mostraron un decrecimiento a pH más altos. *Dothiorella viticola* fue la única especie que mostró una ligera fitotoxicidad en el extracto orgánico a pH no modificado (Figura 3.4).

A partir de las diálisis de la fase acuosa se obtuvo una cantidad de residuos de bajo peso molecular (fracción OUT) 2 ó 3 veces superior a la recuperada en la fase IN (Tabla 3.2). Los mayores valores se recogieron de *N. luteum* (IN: 5,7 mg) y *B. dothidea* (OUT: 21,4 mg) mientras que los menores correspondieron a *Do. viticola* para ambas fases (IN: 2,8 mg, OUT: 5,0 mg).

Tabla 3.1 Residuos obtenidos (en mg) de los extractos orgánicos y de las fases acuosas a partir de los filtrados del cultivo líquido de las cinco especies de Botryosphaeriaceae del estudio.

Especies	pH del FC ^a	pH FC		pH 2		pH 10	
		Orgánico	Acuoso	Orgánico	Acuoso	Orgánico	Acuoso
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	6,6	0,5	104,8	5,2	119,3	0,8	110,5
<i>Diplodia seriata</i>	7,0	0,4	165,9	3,1	136,3	0,5	195,1
<i>Dothiorella viticola</i>	7,5	0,8	46,1	3,8	54,0	0,9	99,7
<i>Neofusicoccum luteum</i>	6,7	1,2	165,2	8,7	167,8	1,0	206,0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	8,7	0,7	125,1	4,1	106,3	0,6	145,8

^a: FC, filtrado del cultivo.

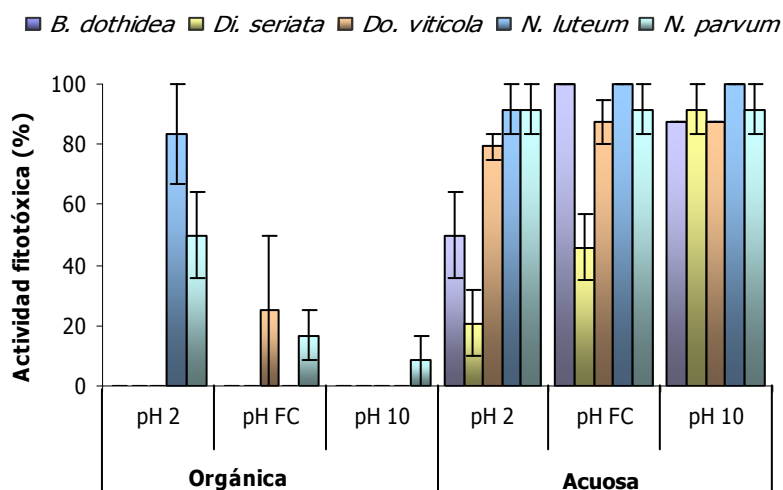


Figura 3.4 Actividad fitotóxica, en plántula de tomate, de la fase orgánica y acuosa a tres pH diferentes a partir del cultivo líquido de cinco especies de Botryosphaeriaceae. Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas. Las barras de error indican el error estándar de la media. pH FC: filtrado del cultivo a pH no modificado.

Tabla 3.2 Productos de las diálisis del filtrado del cultivo y de las precipitaciones de exopolisacáridos (EPS) de las especies de Botryosphaeriaceae en estudio.

Especies	Diálisis FC ^a		Precipitación EPS ^b		
	IN (mg)	OUT (mg)	IN (mg)	OUT (mg)	Etanol (g)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	5,4	21,4	- ^c	-	-
<i>Diplodia seriata</i>	3,1	12,8	-	-	-
<i>Dothiorella viticola</i>	2,8	5,0	-	-	-
<i>Neofusicoccum luteum</i>	5,7	12,8	268,0	307,0	5,014
<i>Neofusicoccum parvum</i>	4,4	15,5	138,7	171,1	5,333

^a: a partir de 3 ml de filtrado del cultivo.

^b: a partir de 800 ml del filtrado del cultivo.

^c: -, no analizado.

La diálisis del precipitado de EPS de *N. luteum* y *N. parvum* proporcionó unos residuos en la fracción IN de 268 mg y 138,7 mg, respectivamente, aunque menores que las fracciones OUT. Sin embargo, la proporción OUT/IN para estas especies no fue tan alta como la observada en la diálisis de los filtrados del cultivo (Tabla 3.2). De todo el proceso, las cantidades mayores para ambas especies se obtuvieron de la fase etanólica.

La actividad fitotóxica de la fracción IN se mostró variable para todas las especies estudiadas (Figura 3.5). La toxicidad producida por *N. luteum* fue la más alta, 88%, mientras que la menor fue para *Di. seriata*, 25%. La fracción OUT sólo produjo actividad fitotóxica para *B. dothidea*, *N. luteum* y *N. parvum*, y en niveles menores que para los mismos de la fracción IN.

En la dialización de los EPS, *N. luteum* mostró actividades similares para ambas fracciones mientras que *N. parvum* demostró ser fitotóxico sólo en la fracción IN (Figura 3.6). Los residuos de la fase etanólica mostraron una baja toxicidad para ambas especies de *Neofusicoccum*. El análisis de los glicósidos O-metil acetilados de la parte activa de los EPS de *N. parvum* mostró la predominancia de los monosacáridos manosa, glucosa y galactosa, en proporción aproximada 2:1:1.

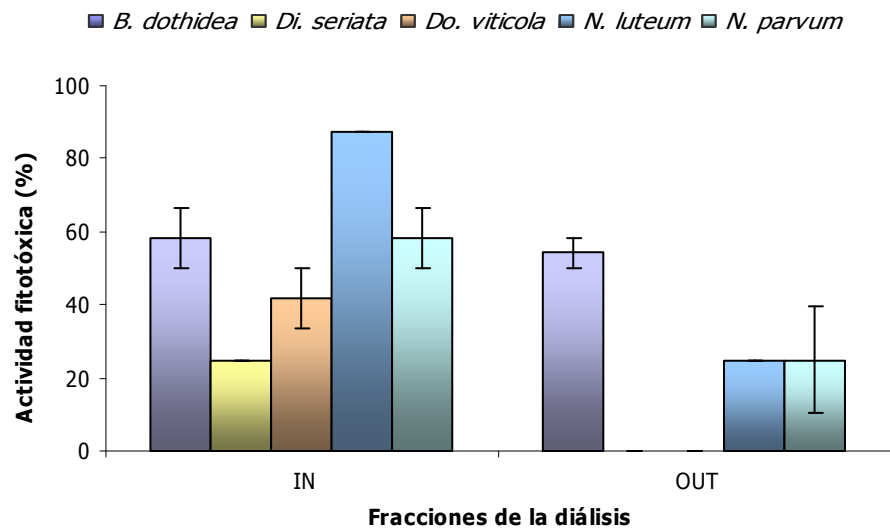


Figura 3.5 Actividad fitotóxica en plántulas de tomate de filtrados del cultivo dializados de cinco aislados de Botryosphaeriaceae. Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas. Las barras de error indican el error estándar de la media.

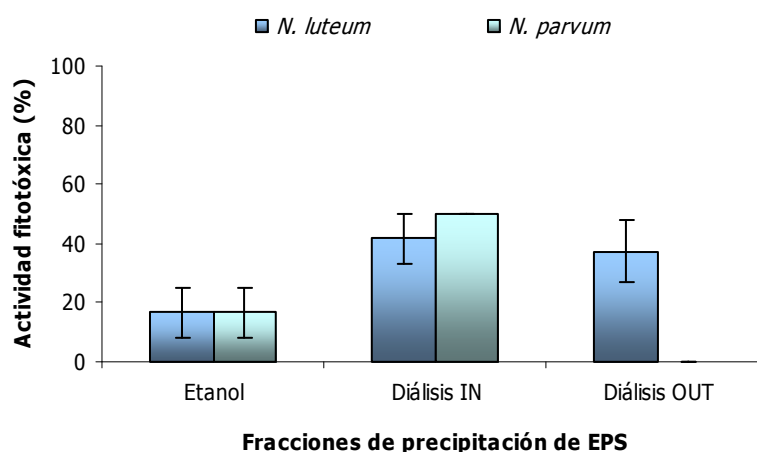


Figura 3.6 Actividad fitotóxica en plántulas de tomate de precipitados de EPS dializados de *Neofusicoccum luteum* y *Neofusicoccum parvum*. Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas. Las barras de error indican el error estándar de la media.

La columna cromatográfica del extracto orgánico ácido de *N. luteum* se cargó con 572 mg de extracto, procedentes de 800 ml de filtrado del cultivo. Tras el proceso cromatográfico se recuperaron 115 mg, divididos en 11 grupos homogéneos: 1-2 (1,5 mg), 3-4 (1,6 mg), 5-7 (3,3 mg), 8 (2,8 mg), 9-11 (18,6 mg), 12-18 (30,1 mg), 19-26 (13,6 mg), 27-51 (22,6 mg), 52-80 (8,2 mg), 81-Final (10,3 mg) y metanol (MeOH) (3,0 mg). En la cromatografía de *N. parvum* se recuperaron 122 mg de los 173 mg cargados, procedentes de 800 ml de filtrado del cultivo. El fraccionamiento de este extracto generó siete grupos homogéneos: 1-8 (14,0 mg), 9-14 (7,4 mg), 15-30 (14,3 mg), 31-61 (10,0 mg), 62-80 (1,4 mg), 81-Final (15,0 mg) y MeOH (102 mg). Las fracciones recuperadas tras la cromatografía líquida representan un 20% del extracto inicial para *N. luteum* y un 70% para *N. parvum*. La baja proporción recuperada en la columna de *N. luteum* se explica por la predominancia en el extracto de un pigmento que permaneció retenido, por su gran polaridad, en la parte superior de la columna cromatográfica.

Los grupos obtenidos de la columna de *N. luteum* mostraron un rango de toxicidad entre bajo y moderado ($\leq 50\%$) en todas las fracciones excepto en la tercera, que no mostró

ninguna actividad (Figura 3.7a). La toxicidad mayor (50%) se registró en la primera fracción (1-2), moderada en la segunda y en las tres últimas fracciones y baja en las intermedias. Para *N. parvum*, la mayor fitotoxicidad se exhibió en los metabolitos menos polares, presentes en los dos primeros grupos (1-8 y 9-14) con valores de 95% y 75%, respectivamente (Figura 3.7b). Las tres últimas fracciones (62-80, 81-Final y MeOH) se mostraron prácticamente inactivas, a pesar de que los metabolitos que contienen representan una parte importante (62%) del peso total del extracto.

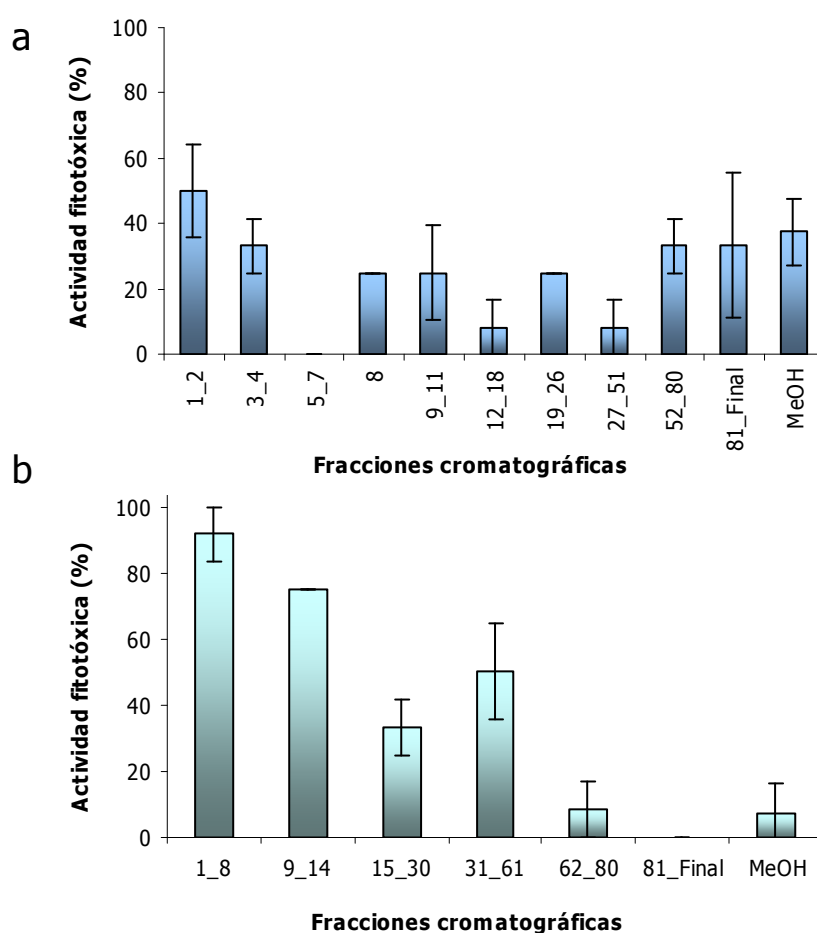


Figura 3.7 Actividad fitotóxica, en plántula de tomate, de las fracciones cromatográficas procedentes de los extractos orgánicos ácidos de *Neofusicoccum luteum* (a) y *N. parvum* (b). Las sustancias control (medio Czapeck-Dox y agua destilada) no se representan por no causar síntomas. Las barras de error indican el error estándar de la media.

3.4 DISCUSIÓN

A pesar de los progresos en la identificación de toxinas, se ha avanzado poco en el estudio de los metabolitos fitotóxicos de las especies de Botryosphaeriaceae asociadas con el decaimiento de vides. Según nuestro conocimiento, con el presente trabajo se ha estudiado por primera vez la producción de metabolitos fitotóxicos en especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vides afectadas de decaimiento. Se conocen algunas sustancias tóxicas producidas por especies que, aunque se pueden encontrar en vid, sólo se han identificado en otros hospedadores. Venkatasubbaiah y Chilton (1990) identificaron las toxinas: meleína, tirosol, 4-hidroximeleína, 5-hidroximeleína y 4-hidroxibenzaldehído en el filtrado del cultivo de "*Botryosphaeria*" *obtusa*, agente causal de la pudrición negra del fruto del manzano. Otra especie de la familia, *Lasiodiplodia theobromae* (aislado DABAC-P82) se caracteriza por la producción de β -glucano (Selbmann et al. 2003).

Los resultados obtenidos indican que las cinco especies de Botryosphaeriaceae estudiadas exhibieron propiedades fitotóxicas aunque en diferente grado según la especie. En el caso de *N. luteum* y *N. parvum* se registró una actividad tóxica importante y de forma reiterada en las diferentes fases ensayadas, lo que podría sugerir que los metabolitos fitotóxicos estarían involucrados en la virulencia de ambas especies en planta. Mientras la virulencia en vid de *N. luteum* CBS 121482 se determinó en un experimento de nuestro equipo (datos no publicados, ver capítulo 4), la de *N. parvum* ya ha sido demostrada en estudios previos (Van Niekerk et al. 2004) y confirmada también por nuestro equipo (ver capítulo 4). Además, se apreciaron importantes daños en las hojas de vid inmersas en el filtrado del cultivo de *N. parvum*, entre ellos, marchitamiento, decoloración y necrosis en la superficie foliar. Estos síntomas parecen ser similares a aquellos causados por los filtrados del cultivo, EPS y extractos orgánicos de *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora* (Sparapano et al. 2000).

Las tres especies restantes, *B. dothidea*, *Di. seriata* y *Do. viticola*, mostraron una fitotoxicidad menor en comparación con *N. luteum* y *N. parvum*, aunque ésta fue variable en

las diferentes pruebas realizadas. No ha sido posible establecer una relación clara entre la actividad fitotóxica de estas tres especies y la virulencia que la bibliografía les reconoce (Van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005; Úrbez-Torres et al. 2007). De las tres especies, *Di. seriata* ha sido la especie que menor actividad mostró en los diversas categorías (excepto a pH 10 de la fase acuosa). La patogenicidad de esta especie es un ejemplo de controversia, ya que mientras unos autores la clasifican como virulenta (Castillo-Pando et al. 2001; Auger et al. 2004; Van Niekerk et al. 2004) otros la han descrito como patógeno débil (Phillips 2002; Taylor et al. 2005). *Dothiorella viticola* apuntó una ligera actividad fitotóxica sobre tomate en la fase orgánica a pH sin modificar, e incluso, en vid, genera necrosis ligeramente mayores que las plantas control (Van Niekerk et al. 2004; Úrbez-Torres et al. 2007). Por su parte, *B. dothidea*, con actividad exclusiva en la fase acuosa, ha sido catalogada como patógeno de baja virulencia (Van Niekerk et al. 2004).

Se establecieron dos periodos de incubación óptimos para que las especies alcanzasen la fitotoxicidad máxima en el cultivo estacionario: 14 días para *Di. seriata* y *N. parvum*, y 21 días para las restantes. En general, la acidificación del filtrado permitió extraer las mayores cantidades de compuestos orgánicos mientras que los compuestos hidrofílicos se obtuvieron mejor en medio básico.

Los primeros estudios del filtrado de *N. luteum* y *N. parvum* mostraron que ambas especies producen fitotoxinas de naturaleza lipofílica y de bajo peso molecular. En las TLC preparadas con los metabolitos orgánicos de estos dos hongos se puntearon también con dos meleínas purificadas en el laboratorio del Dr. Evidente (Univ. Federico II, Nápoles, Italia). Las placas mostraron, en cada una de las metodologías empleadas, patrones de puntos diferentes entre las meleínas y los metabolitos de los dos *Neofusicoccum*. Por tanto, estos compuestos parecen ser diferentes de las meleínas y fenoles identificados en estudios bibliográficos previos a partir de *Di. seriata* (Venkatasubbaiah y Chilton 1990; Venkatasubbaiah et al. 1991). Todas las fracciones orgánicas con propiedades fitotóxicas de estas dos especies de *Neofusicoccum*

revelaron en las TLC de diferentes eluentes que los metabolitos presentes poseían un patrón cromatográfico similar (datos no mostrados).

Las cinco especies de Botryosphaeriaceae ensayadas produjeron compuestos fitotóxicos de naturaleza hidrofílica y de elevado peso molecular. El análisis mediante GC-MS de los glicósidos de los EPS de *N. parvum* reveló que dichos compuestos estaban formados por glucosa, manosa y galactosa principalmente, los cuales son diferentes de los botriosfaeranos (*botryosphaerans*). Los botriosfaeranos, (1→3; 1→6)-β-D-glucanos, son producidos por "*B.*" *rhodina* (Corradi da Silva et al. 2005) y por una especie lignolítica no identificada de Botryosphaeriaceae (Barbosa et al. 2003).

La implicación de los EPS en enfermedades de origen fúngico y bacteriano es conocida desde hace décadas por la comunidad científica (Hogdson et al. 1949, Harborne 1983; Denny 1995), aunque su papel como fitotoxinas todavía debe ser clarificado (Van Alfen 1989; Denny 1995). En algunos casos, se ha reconocido el efecto tóxico en planta de polisacáridos producidos por hongos patógenos tales como *Hymenula cerealis* Ellis & Everh. (= *Cephalosporium gramineum* Y. Nisik. & Ikata) (Spalding et al. 1961), *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) J. Hunt (McWain y Gregory 1972), *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. (Strobel et al. 1978), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Thomas 1949), y diversas especies de *Phytophthora* de Bary, como *P. cinnamomi* Rands, *P. megasperma* var. *sojae* A.A. Hildebr. y *P. palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler (Keen et al. 1975). Concretamente, los filtrados de *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* Pethybr. & Laff. y *P. nicotianae* Breda de Haan llegaron a causar un marchitamiento acusado en diversos hospedadores (Woodward et al. 1980). Estas macromoléculas interferirían en la circulación de agua en los tejidos vegetales al taponar los vasos, lo que generaría los síntomas de marchitamiento (Barbosa et al. 2003). Este fenómeno parece, por tanto, estar más relacionado con el tamaño de las moléculas y su viscosidad que con su estructura (Harborne 1983). Por otro lado, el aislamiento reciente de EPS de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr (Corsaro et al. 1998b), *Phomopsis foeniculi* Du Manoir & Vegh (Corsaro et al. 1998a), *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* (Sparapano et al.

2000), que provocan efectos fitotóxicos tanto en sus hospedadores naturales como en otros, sugeriría un carácter no específico de estos metabolitos tóxicos. Algunos ensayos de especificidad podrían apuntar a un comportamiento diferente. Por ejemplo, se ha sugerido una cierta relación entre toxicidad y especificidad en algunas enfermedades bacterianas que causan necrosis en hoja (Rudolph et al. 1989).

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Amusa, N. A. (2006). Microbially produced phytotoxins and plant disease management. *African Journal of Biotechnology* 5, 405-414.
- Auger, J., Esterio, M., Ricke, G. y Pérez, I. (2004). Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88, 1286.
- Barbosa, A. M., Steluti R. M., Dekker, R. F. H., Cardoso, M. S. y Corradi Da Silva, M. L. (2003). Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research* 338, 1691-1698.
- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, CD., Priest, M. y Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30, 59-63.
- Corradi Da Silva, M. L., Izeli, N. L., Martinez, P. F., Silva, I. R., Costantino, C. J. L., Cardoso, M. S., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H. y Da Silva, G. V. J. (2005). Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydrate Polymers* 61, 10-17.
- Corsaro, M. M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Molinaro, A., Mugnai, L., Parrilli, M. y Surico, G. (1998a). Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis foeniculi*. *Carbohydrate Research* 308, 349-357.
- Corsaro, M. M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parrilli, M. y Sparapano, L. (1998b). Phytotoxic extracellular polysaccharides fractions from *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. *Carbohydrate Polymers* 37, 167-172.
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 173-197.
- Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A. y Bruno, G. (2000). Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 162-168.
- Fallot, J., Deswarte, C., Dalmayrac, S., Colrat, S. y Roustan J. P. (1997). L'eutypiose de la vigne: isolement d'une molécule synthétisée par *Eutypa lata* et toxique pour la vigne. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie* 320, 149-158.
- Harborne, J. B. (1983). Toxins of plant-fungal interaction. In: R.F. Keeler & A.T. Tu (eds.), *Handbook of Natural Toxins: Plant and fungal toxins* Vol. 1. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. (EE.UU.). pp. 743-782.
- Hogdson, R., Peterson, W. H. y Riker, A. J. (1949). The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings. *Phytopathology* 39, 47-62.

- Holst, O. (2000) Deacylation of lipopolysaccharides and isolation of oligosaccharide phosphates. In: O. Holst (ed.), *Methods in Molecular Biology, Bacterial Toxins: Methods and protocols*. Humana Press Inc. Totowa, Nueva Jersey (EE.UU.). pp. 345-353.
- Keen, N. T., Wang, M. C., Bartnicki-Garcia, S. y Zentmeyer, G. A. (1975). Phytotoxicity of myco-laminarans- β -1,3-glucans from *Phytophthora* spp. *Physiological Plant Pathology* 7, 91-97.
- Lardner, R., Mahoney, N., Zanker, T. P., Molyneux, R. J. y Scott, E. S. (2006). Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: analysis of the extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 107-114.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J., Smith, L. R., Schoch, T. K., Rolshausen, P. E. y Gubler, W. D. (2005). Dying-arm disease in grapevines: Diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8148-8155.
- McWain, P. y Gregory, G. F. (1972). A neutral mannan from *Ceratocystis fagacearum* culture filtrate. *Phytochemistry* 11, 2609-2612.
- Perrin-Cherieux, S., Abou-Mansour, E. y Tabacchi, R. (2004). Synthesis and activity of grape wood phytotoxins and related compounds. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 83-86.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Rudolph, K. W. E., Gross, M., Neugebauer, M., Hokawat, S., Zachowski, A., Wanddra, K. y Klement, Z. (1989). Extracellular polysaccharides as determinants of leaf spot diseases caused by pseudomonads and xanthomonads. (In: A. Graniti, R. D. Durbin & A. Ballio (eds.), *Phytotoxins and plant pathogenesis* NATO, ASI series, Berlin: Springer-Verlag. pp. 177-218.
- Selbmann, L., Stinglele, F. y Petruccioli, M. (2003). Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 135-145.
- Spalding, D. H., Bruehl, G. W. y Foster, R. J. (1961). Possible role of pectinolytic enzymes and polysaccharide in pathogenesis by *Cephalosporium gramineum* in wheat. *Phytopathology* 51, 227-235.
- Sparapano, L., Bruno, G. y Graniti, A. (2000). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 169-177.
- Strobel, G. A., Van Alfen, N., Hapner, K. D., McNeil, M. y Albersheim, P. (1978). Some phytotoxic glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, the Dutch Elm Disease pathogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 538, 60-75.
- Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C. y Dubin, G. M. (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 156-161.
- Taylor, A., Hardy, G. E. S., Wood, P. y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187-195.
- Thomas, C.A. (1949). A wilt-inducing polysaccharide from *Fusarium solani* f. *eumartii*. *Phytopathology* 39, 572-579.
- Úrbez-Torres J. R., Gubler W. D. y Luque, J. (2007). First report of *Botryosphaeria iberica* and *Botryosphaeria viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91, 772.
- Van Alfen, N. K. (1989). Reassessment of plant wilt toxins. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 533-550.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H. y Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.
- Venkatasubbaiah, P. y Chilton, W. S. (1990). Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*. *Journal of Natural Products* 53, 1628-1630.
- Venkatasubbaiah, P., Sutton, T. B. y Chilton, W. S. (1991). Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. *Phytopathology* 81, 243-247.
- Vinogradov, E. V., Holst, O., Thomas-Oates, J. E., Broady, K. W. y Brade H. (1992). The structure of the O-antigenic polysaccharide from lipopolysaccharide of *Vibrio-cholerae* strain H11 (non-O1). *European Journal of Biochemistry* 210, 491-498.

Woodward, J. R., Keane, P. J. y Stone, B. A. (1980). Structures and properties of wilt-inducing polysaccharides from *Phytophthora* spp. *Physiological Plant Pathology* 16, 439-454.

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERiaceae EN VID

4.1	INTRODUCCIÓN	112
4.2	MATERIAL Y MÉTODOS	113
4.2.1	Material vegetal y aislados fúngicos	113
4.2.2	Pruebas de patogenicidad	114
4.2.3	Análisis de datos	115
4.3	RESULTADOS	115
4.3.1	Seca del sarmiento	117
4.3.2	Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos	118
4.3.3	Necrosis vasculares	120
4.4	DISCUSIÓN	124
4.5	BIBLIOGRAFÍA	128

RESUMEN

En este estudio se ha llevado a cabo una caracterización de la patogenicidad de seis especies de Botryosphaeriaceae procedentes de los viñedos muestreados en Cataluña (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme*). Para ello, se realizaron inoculaciones con distintos aislados de estas especies en sarmientos maduros de una variedad de uva blanca (Macabeo) y una tinta (Tempranillo). Para evaluar la patogenicidad de los hongos ensayados se analizaron cuatro variables: muerte del sarmiento, producción de chancros y fructificaciones fúngicas y longitud de las necrosis vasculares causadas por los hongos. A las pocas semanas de la inoculación, el 22% de los sarmientos inoculados con *N. parvum* y *N. luteum* murió. Estas mismas especies se revelaron como las más virulentas, mostrando los valores más altos para el resto de variables medidas, con necrosis que en muchos casos superaron la decena de centímetros. *Dothiorella viticola*, *N. vitifusiforme* y *Di. seriata* causaron las necrosis vasculares más pequeñas mientras que las necrosis debidas a *B. dothidea* mostraron valores intermedios. *Diplodia seriata* ofreció mucha variabilidad en las variables analizadas, lo que no dejó clara su virulencia en *Vitis*.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia Botryosphaeriaceae son hongos cosmopolitas que poseen un amplio rango de hospedadores y una extensa distribución geográfica (Barr 1972). Dentro de la familia, las especies se han descrito como saprofitas o parásitas (Smith et al. 1996), pudiendo causar chancros, decaimiento y otras enfermedades en leñosas (Michailides 1991; Phillips 2000; Denman et al. 2003; Slippers et al. 2004). La importancia de las especies de Botryosphaeriaceae como patógenos de vid está aumentando en los últimos años, ya que cada vez es más común aislar estas especies como único agente patógeno (Fourie y Halleen 2001; Auger et al. 2004; Taylor et al. 2005). Se han descrito al menos 13 especies de la familia aisladas de vid y, aunque las especies presentes y su frecuencia varía mucho en función de la región vitícola, las más comunes son, a nivel general, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Di. mutila*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. ribis* (Pascoe 1998; Phillips 2002; Van Niekerk et al. 2006).

El creciente número de especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vides enfermas, junto con la complicada taxonomía de la familia, han dificultado la caracterización patogénica de dichas especies (Phillips 2002; Van Niekerk et al. 2006). Phillips (1998) describió por primera vez a *B. dothidea* como patógeno de vid en Portugal, aunque posteriormente se vio que algunos de los aislados estudiados correspondían en realidad a *N. parvum* (Alan Phillips com. pers.). En un trabajo posterior, Phillips (2002) consideró *N. parvum* como uno de los agentes implicados en el decaimiento de la vid. Van Niekerk et al. (2004) realizaron tres tipos diferentes de inoculaciones con aislados sudafricanos y, de las más de ocho especies ensayadas, *N. parvum* y *N. australe* destacaron por causar las lesiones más importantes. *Diplodia seriata* se ha aislado en múltiples ocasiones y su patogenicidad es un tema que genera una controversia considerable. Algunos autores consideran a esta especie como un parásito secundario o saprofito (Phillips 1998; Taylor et al. 2005), mientras que otros, la consideran directamente relacionada con el BDA en diversos países (Larignon y Dubos 2001; Auger et al. 2004).

El presente estudio se ha centrado en la caracterización patogénica de aislados de Botryosphaeriaceae procedentes de muestreos en viñedos catalanes (ver capítulo 1). Se ha estudiado la patogenicidad de cuatro de las especies más comunes en vid (*B. dothidea*, *Di. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum*), además de *Dothiorella viticola* y *N. vitifusiforme*. Además de la comparación entre especies, se ha realizado una prueba de la patogenicidad con distintos aislados de *Di. seriata* y *N. parvum*, las dos especies más frecuentes en los viñedos muestreados, para estudiar la variabilidad intraespecífica en la virulencia de estas dos especies.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos

En este ensayo se emplearon las variedades de vid Tempranillo (uva tinta) y Macabeo (blanca). Las plantas de vid fueron suministradas por los viveros de Bodegas Miguel Torres; se sirvieron con una edad de 1 año, injertadas sobre el patrón Richter 110 y con raíz. A principios del mes de abril de 2004, las vides se plantaron en macetas de 3 litros utilizando como sustrato arena roja, arena de sílice blanca y turba (Floragard Floratorf, Oldenburg, Alemania), en proporción 3:2:2 (v:v:v). Las plantas se mantuvieron en un invernadero dotado de riego por goteo automatizado y de un sistema de refrigeración *cooling*. Las plantas se fertilizaron semanalmente con 10 ml de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Aaron 1950) con la siguiente proporción de macronutrientes: 4% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,5% de KNO_3 , 2,5% de MgSO_4 y 0,7% de KH_2PO_4 y de micronutrientes: 1,4% de H_3BO_3 y trazas, inferiores al 1%, de Mn Cl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , Fe (EDTA) y H_2MoO_4 .

Para esta prueba de patogenicidad, se seleccionó un aislado de cada unas de las especies de Botryosphaeriaceae recuperadas en nuestros muestreos de campo, exceptuando, *Di. seriata* y *N. parvum*, para las que seleccionaron cuatro aislados por especie (Tabla Anexo 2). Los inóculos se prepararon a partir de fragmentos de micelio de los aislados, incubados a 25° C en PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) y durante un máximo de 7 días antes de la inoculación.

4.2.2 Pruebas de patogenicidad

El estudio del carácter patogénico de los aislados se llevó a cabo mediante inoculaciones controladas siguiendo los postulados de Koch (Agrios 1969). Las inoculaciones se dividieron en dos años, 2004 y 2005. A finales del mes de mayo de 2004 se inocularon las especies *B. dothidea*, *Di. seriata*, *Do. viticola* y *N. parvum* y en el mismo mes de 2005 se inocularon *N. luteum* y *N. vitifusiforme*, siguiendo el mismo protocolo. En cada planta se practicó una incisión con ayuda de un bisturí estéril, en un entrenudo del sarmiento del año anterior. En los cortes, de unos 2 cm de longitud y pocos milímetros de profundidad, se dispuso como inóculo un fragmento de micelio de unos 2,5 mm, con la cara miceliar en contacto con los tejidos vasculares. El corte se volvió a cerrar y se selló con Parafilm® (Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, EE.UU.). Para los controles se utilizaron fragmentos de PDA estéril de idéntico tamaño, utilizando la misma técnica de inoculación. En la primera inoculación se emplearon 18 plantas por variedad, aislado y control, y en la segunda, 10, ya que la reducción en el número de réplicas no alteró la varianza de la muestra. Las plantas se mantuvieron en el invernadero en condiciones de riego favorable mientras se desarrolló el experimento.

Durante el primer mes tras la inoculación, se realizó un seguimiento diario de las plantas inoculadas para detectar la posible muerte o seca de la planta. Transcurridos 6 meses, se anotaron los siguientes datos de cada planta: formación de chancro en el punto de inoculación, aparición de fructificaciones en torno a la herida y longitud de las necrosis vasculares por encima y por debajo del punto de inoculación. La necrosis total se obtuvo a partir de la suma de las dos longitudes anteriores. Para medir las lesiones internas se eliminaron la corteza y los tejidos subyacentes con ayuda de un bisturí y se anotó la longitud de la zona necrótica. Finalmente, se tomaron fragmentos de los tejidos afectados para reaislar el hongo inoculado y completar así los postulados de Koch. De las plantas que presentaban las necrosis más desarrolladas, los aislamientos se hicieron a intervalos de dos centímetros desde el punto de inoculación hasta completar la longitud de la zona necrosada. Los fragmentos se

esterilizaron en superficie por inmersión en alcohol al 70%, durante 4 minutos, y se sembraron en medio nutritivo PDA suplementado con sulfato de estreptomicina (100 unidades/ml) (Johnston y Booth 1983). Las placas se incubaron a 25° C y se realizó un seguimiento diario, durante un máximo de una semana, para verificar el reaislamiento de las diferentes especies.

4.2.3 Análisis de datos

Una vez recopilados los datos, se realizó un estudio comparativo entre las diferentes especies de Botryosphaeriaceae y entre los aislados de *Di. seriata* y *N. parvum*. Para establecer las relaciones de dependencia entre las variables discretas (formación de chancro y aparición de fructificaciones) y los factores (variedad de viña, especie y aislado inoculado) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En el caso de las variables continuas (longitud de las necrosis inferior, superior y total) se empleó el análisis de la varianza (ANOVA). Previamente, se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos y, en caso de necesidad, se transformaron logarítmicamente para cumplir con estos dos requisitos (Quinn y Keough 2002). Tras el ANOVA, se aplicó el test de Dunnett que identifica los aislados con necrosis significativamente mayores a las del control. Finalmente, para conocer la progresión del hongo por el sarmiento, se compararon las necrosis superiores e inferiores con una t-student de medidas repetidas, para lo cual se realizó primero la transformación de la raíz cuadrada de los datos. Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa Statistica versión 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

4.3 **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad se resumen en la Tabla 4.1. Las plantas control mostraron heridas bien cicatrizadas, sin chancros ni fructificaciones fúngicas en torno al punto de inoculación. Las necrosis vasculares en estas plantas sólo superaron el centímetro en las inoculaciones de Tempranillo de 2004.

Tabla 4.1 Resultados de las pruebas de patogenicidad de distintas especies de Botryosphaeriaceae sobre plantas de vid de las variedades Macabeo y Tempranillo.

Especie	Aislado	Fecha inoculación	Variedad											
			Macabeo						Tempranillo					
			N	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	% Reaisl.	N	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	% Reaisl.
Control		2004	18	0	0	0	0,9	0	18	0	0	0	2,0	0
		2005	10	0	0	0	0,2	0	10	0	0	0	0,7	0
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS121484	2004	18	0	15	4	3,2	100	18	0	14	3	3,2	100
<i>Diplodia seriata</i>	CBS121485 (JL398)	2004	18	0	10	7	2,4	100	18	0	8	3	3,5	67
	JL421	2004	18	0	2	0	0,8	83	18	0	0	0	1,9	28
	I-29	2004	18	0	12	10	1,6	89	18	0	5	7	3,0	78
	I-50	2004	18	0	15	6	1,5	100	18	0	8	10	3,6	83
Total <i>Di. seriata</i>		2004	72	0	39	23	1,6	93	72	0	21	20	3,0	64
<i>Dothiorella viticola</i>	CBS117006	2004	18	0	4	0	1,7	61	18	0	6	0	2,1	39
<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS121482 ^a	2005	10	3	5	10	8,6	100	10	6	10	10	8,2	100
<i>Neofusicoccum parvum</i>	JL387	2004	18	0	6	7	4,0	94	18	0	17	6	5,6	100
	CBS121486 (JL396) ^a	2004	18	5	9	14	10,8	89	18	1	9	17	13,8	78
	JL434 ^a	2004	18	5	18	18	12,7	100	18	0	9	18	11,6	100
	JL444 ^a	2004	18	1	18	4	6,7	100	18	0	18	10	6,9	94
Total <i>N. parvum</i>		2004	72	11	51	43	8,5	96	72	1	53	51	9,4	93
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	CBS121481	2005	10	0	2	0	1,8	100	10	0	7	8	2,5	100

^a Para estos aislados, los resultados se leyeron a los dos meses de la inoculación.

N: Número de plantas inoculadas.

Muertas: Número de plantas con el sarmiento inoculado muerto o seco.

Chancro: Número de plantas en las que se formó chancro en el punto de inoculación.

Fructificaciones (Fruct.): Número de plantas en las que aparecieron fructificaciones en torno al punto de inoculación.

Longitud de la necrosis total (Necr.): Suma de la longitud de las necrosis superior e inferior desde el punto de inoculación (en cm). En negrita, necrosis significativamente distintas al control según el test de Dunnett.

Porcentaje de reaislamiento (% Reaisl.): Porcentaje de reaislamiento de la especie inoculada a partir de la madera infectada.

4.3.1 Seca del sarmiento

Neofusicoccum luteum y *N. parvum* causaron la seca del sarmiento inoculado a las dos semanas de la inoculación. Los aislados CBS121486 (JL396), JL434 y JL444 de *N. parvum* provocaron la muerte del sarmiento de 11 plantas de Macabeo y una de Tempranillo, mientras que *N. luteum* desecó el sarmiento en seis vides Macabeo y tres Tempranillo (Tabla 4.1 y Figura 4.1 a-c). Ninguna otra especie fúngica causó la muerte o seca del sarmiento de vid. Para evitar una colonización secundaria de hongos saprofitos que alterara las plantas muertas, se procedió a la lectura de resultados de dichas plantas a los dos meses de la inoculación. En todas las plantas inoculadas con *N. luteum* y *N. parvum*, de las que se pudo tomar medida de la necrosis, se apreciaron importantes daños vasculares, con necrosis bien marcadas (Figura 4.2 a-c). En

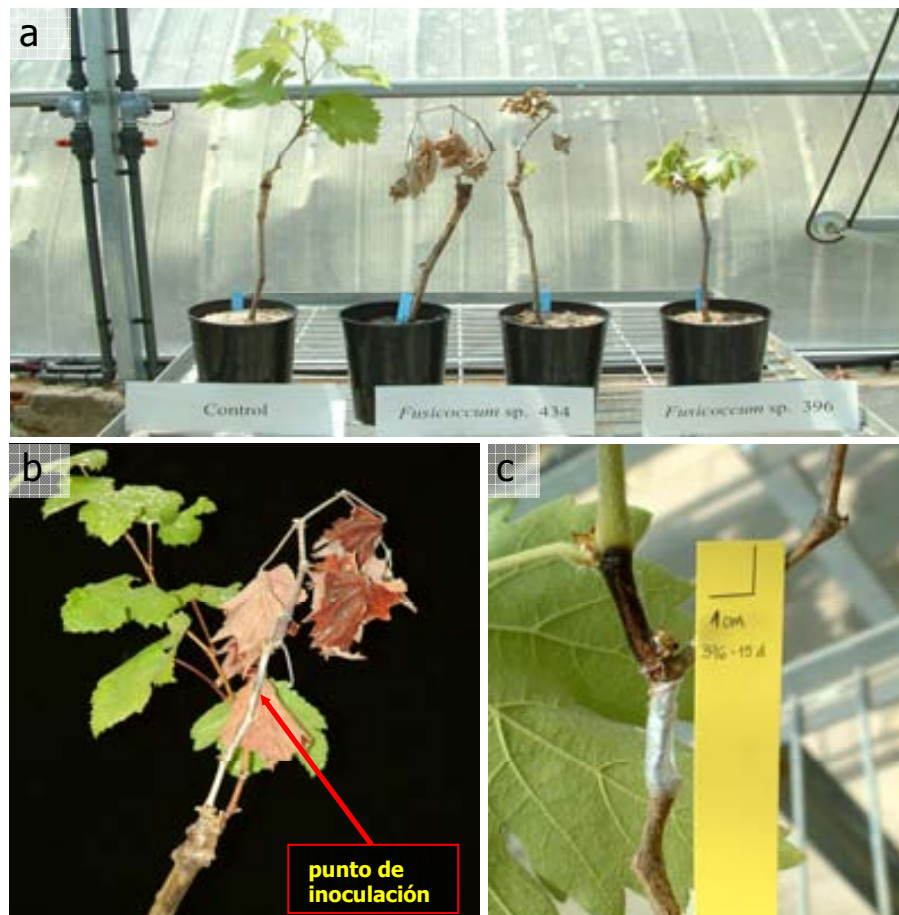


Figura 4.1 Síntomas observados en plantas de vid inoculadas con *Neofusicoccum parvum*. Plantas inoculadas con los aislados JL434 y CBS121486 (JL396) y el control tras 3 semanas de inoculación (a), seca del sarmiento inoculado y rebrote por debajo del punto de inoculación (b) y necrosis tras 15 días de inoculación con el aislado CBS121486 (JL396) (c).



Figura 4.2 Lesiones en la madera causadas por *Neofusicoccum parvum*. Necrosis sectorial en corte transversal en un sarmiento inoculado con el aislado CBS121486 (JL396) **(a)**, necrosis longitudinal en la mitad inferior del sarmiento **(b)** y necrosis superior **(c)**.

muchos casos, también aparecieron cuerpos fructíferos del hongo en torno al punto de inoculación. De estas plantas, se recuperaron fragmentos afectados hasta una distancia de 7 cm del punto de inoculación y se realizó el hongo inoculado de todos ellos en el 100% de los casos.

4.3.2 Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos

Según los resultados estadísticos, la formación de chancro en torno al punto de inoculación (Figura 4.3a) dependió de la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$). El 81% de las plantas inoculadas con *B. dothidea* presentaron chancro, el 75% de las inoculadas con *N. luteum*, el 72% con *N. parvum*, el 42% con *Di. seriata*, el 28% de las inoculadas con *Do. viticola* y, por último, el 24% con *N. vitifusiforme* (Figura 4.3b). Se detectó una variabilidad significativa ($p < 0,01$) en la formación de chancros según el aislado inoculado de las especies *Di. seriata* y *N. parvum*. El aislado JL444 de *N. parvum* generó chancros en el 100% de las plantas inoculadas mientras que los otros aislados mostraron porcentajes cercanos al 75%. En el caso de *Di. seriata*, el aislado JL421 causó tan sólo un 10% de chancros cuando los otros tres

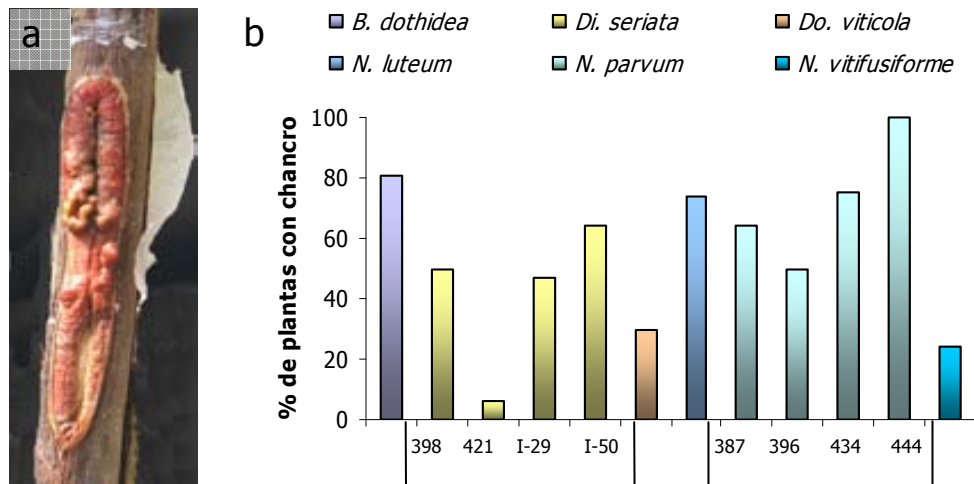


Figura 4.3 Producción de chancros sobre el punto de inoculación. Chancro formado en una planta inoculada con *Neofusicoccum parvum* CBS121486 (JL396) (a) y porcentaje de plantas que presentaron chancros en inoculaciones con distintas especies de Botryosphaeriaceae (b).

aislados ofrecieron porcentajes en torno al 50%. Según el análisis estadístico, la formación de chancros fue independiente de la variedad de uva inoculada ($p = 0,37$).

Los cuerpos fructíferos de los hongos aparecieron sobre los tejidos muertos de la planta cercanos al punto de inoculación (Figura 4.4a). Mediante observaciones microscópicas se pudo confirmar su correspondencia con la especie inoculada. Al igual que en la formación de

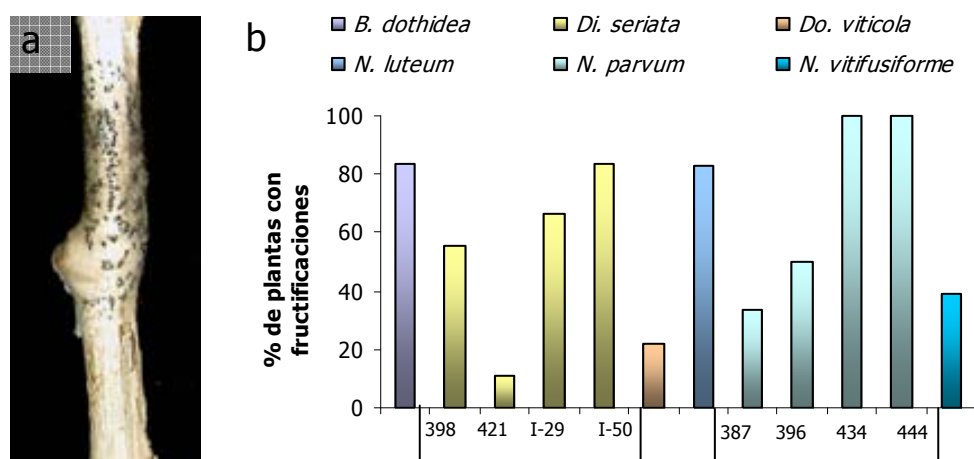


Figura 4.4 Formación de fructificaciones sobre el punto de inoculación. Fructificaciones presentes en una planta inoculada con *Neofusicoccum parvum* CBS121486 (JL396) (a) y porcentaje de plantas que presentaron fructificaciones en inoculaciones con distintas especies de Botryosphaeriaceae (b).

chancros, la producción de cuerpos fructíferos dependió significativamente de la especie inoculada ($p < 0,01$). Las especies que más fructificaron fueron *N. luteum* y *B. dothidea*, ambas en el 83% de las plantas inoculadas, seguidas de *N. parvum* (71%), *Di. seriata* (54%), *N. vitifusiforme* (39%) y, por último, *Do. viticola* (22%) (Figura 4.4b). El análisis estadístico confirmó la dependencia significativa entre el porcentaje de fructificación y los aislados de *Di. seriata* y *N. parvum* ($p < 0,01$). Así por ejemplo, en *Di. seriata* las plantas con fructificaciones variaron entre el 11 y el 83% según el aislado inoculado, mientras que en *N. parvum* se observaron entre el 33 y el 100% de las plantas inoculadas. La presencia de estos cuerpos fructíferos fue independiente de la variedad de vid inoculada ($p = 0,10$).

4.3.3 Necrosis vasculares

La morfología de las necrosis observadas varió en función de la especie inoculada. Las especies formaron necrosis cuya intensidad de color estuvo directamente relacionada con la longitud de las mismas. Los colores más intensos se observaron en necrosis largas mientras que los más tenues coincidieron con las longitudes menores. Las lesiones formadas por *N. luteum* y *N. parvum* fueron de un color marrón oscuro y, en muchos casos, derivaron en necrosis sectoriales que reproducen los síntomas observados en planta adulta (Figura 4.2a).

Las dimensiones de las necrosis mostraron diferencias estadísticas significativas según la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$) (Tabla 4.2; Figura 4.5) Las necrosis en Tempranillo fueron mayores a las de Macabeo (de media, 5,5 cm frente a 4,6 cm) aunque no existió evidencia estadística, a nivel global, de que la longitud de las necrosis variase en función de la variedad de vid inoculada ($p = 0,24$). De hecho, todas las especies mostraron necrosis significativamente diferentes al control en ambas variedades. Sin embargo, la interacción entre especie y variedad fue significativa ($p < 0,01$). La mayoría de las especies mostraron necrosis mayores en Tempranillo, salvo *N. luteum*, cuyas necrosis en Macabeo fueron superiores, y *B. dothidea*, en la que fueron iguales. En Macabeo, *N. luteum* y *N. parvum* formaron las mayores necrosis mientras que en Tempranillo fue *N. parvum*.

Tabla 4.2 Resultado del ANOVA multifactorial para el análisis de la longitud de la necrosis según las variedades de vid inoculadas con distintas especies de Botryosphaeriaceae. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
Especie de Botryosphaeriaceae	6	70,74	< 0,01
Variedad de vid	1	1,37	0,24
Especie * Variedad	6	4,92	< 0,01

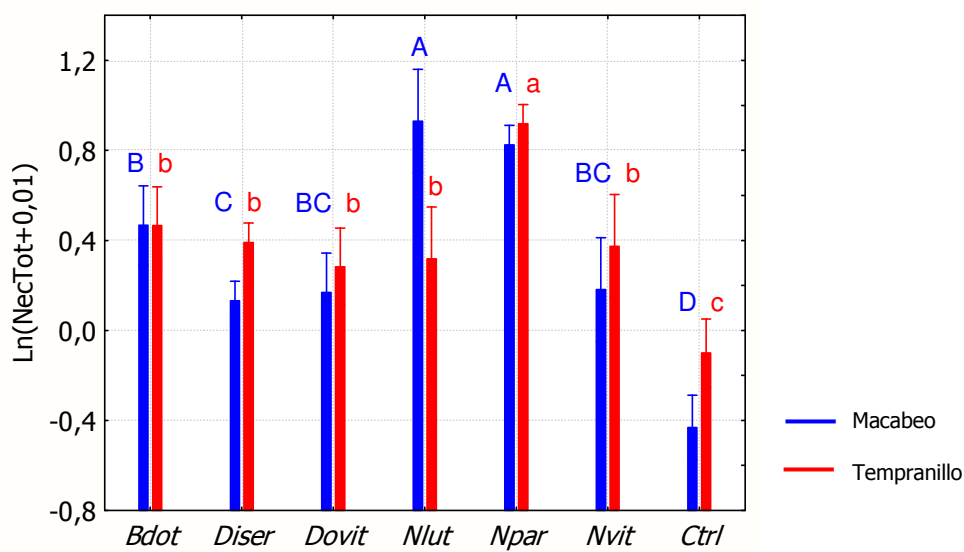


Figura 4.5 Longitud de las necrosis total (variable transformada mediante logaritmo) generadas por las especies de Botryosphaeriaceae inoculadas en Macabeo y Tempranillo. Las letras indican los rangos de significación para el test de Tukey. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

En el análisis por aislados, tanto en *Di. seriata* como en *N. parvum*, fue significativo el efecto del aislado y de la variedad (Tabla 4.3; Figura 4.6). Sin embargo, la interacción no fue significativa para ninguno de los dos conjuntos de aislados. En ambas especies, la mayor parte de aislados formaron necrosis más largas sobre la variedad Tempranillo. Para ambas variedades, el único aislado que no formó necrosis significativamente diferentes al control fue el aislado JL421 de *Di. seriata*.

Tabla 4.3 Resultado del ANOVA multifactorial para el análisis de la longitud de la necrosis según las variedades de vid inoculadas con los aislados de *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum*. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
<i>Aislados de Diplodia seriata</i>			
Aislados de <i>Diplodia seriata</i>	3	39,14	< 0,01
Variedad de vid	1	6,59	< 0,01
Aislado * Variedad	3	1,89	0,33
<i>Aislados de Neofusicoccum parvum</i>			
Aislados de <i>Neofusicoccum parvum</i>	3	17,46	< 0,01
Variedad de vid	1	46,24	< 0,01
Aislado * Variedad	3	1,13	0,13

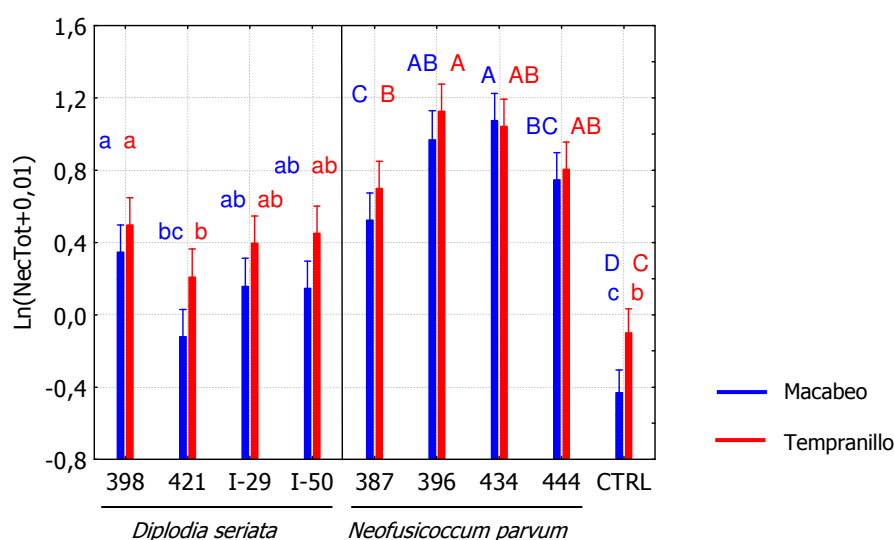


Figura 4.6 Longitud de las necrosis totales (variable transformada mediante logaritmo) generadas por distintos aislados de *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum* inoculadas en Macabeo y Tempranillo. Las letras indican los rangos de significación para el test de Tukey. Las minúsculas se emplean para la comparación entre los aislados de *Diplodia seriata* y las mayúsculas para *Neofusicoccum parvum*. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

La longitud de las necrosis estuvo relacionada con la formación de chancros y la presencia de fructificaciones cuando estas últimas variables se analizaron como factores ($p < 0,01$). En general, la longitud de la necrosis fue 2 cm mayor en plantas con chancro y 4 cm mayor en plantas con fructificaciones, con respecto a los valores de plantas que, respectivamente, no mostraron ni chancro ni fructificaciones (Figura 4.7). La interacción entre chancro y fructificación fue significativa ($p < 0,01$); las plantas que mostraron mayores necrosis presentaron también más fructificaciones.

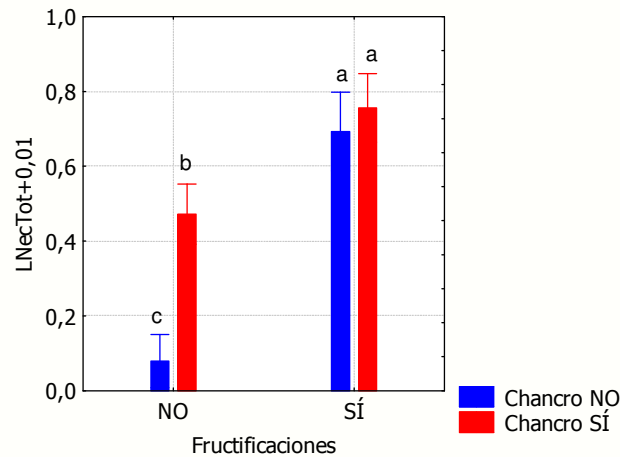


Figura 4.7 Longitud de las necrosis total (variable transformada mediante logaritmo) en presencia y ausencia de fructificaciones y chancro en la planta. Las vocales indican los rangos de significación para el test de Tukey. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

El análisis pareado de la t-student mostró una diferencia significativa ($p = 0,02$) entre las longitudes de las necrosis superior e inferior. En el conjunto de todas las especies inoculadas, la necrosis superior fue unos 5 mm mayor que la inferior. De acuerdo con la variedad de vid inoculada, se observó que en Macabeo no hubo diferencias significativas entre las necrosis superiores e inferiores ($p = 0,68$). Por el contrario, en la variedad Tempranillo los daños por encima del punto de inoculación fueron mayores, en 6 mm, a los inferiores ($p < 0,01$). En el análisis por especie, *N. parvum* mostró una significación importante en la comparación de ambas necrosis ($p < 0,01$), repitiéndose este comportamiento en las dos variedades. Esta especie parece mostrar una tendencia importante a generar mayores daños en la zona superior del punto de inoculación, como lo indica una necrosis superior media de 1,5 cm mayor que la inferior ($p < 0,01$). Los aislados de *Di. seriata* mostraron, sin embargo, un comportamiento inverso, con necrosis descendentes significativamente mayores a las ascendentes, aunque sólo 2 mm ($p < 0,01$). Para el resto de especies no se apreciaron diferencias en cuanto a la longitud de ambas necrosis.

4.4 DISCUSIÓN

Las seis especies de Botryosphaeriaceae ensayadas mostraron diferentes grados de virulencia. La variable principal para evaluar esta virulencia fue la longitud de la necrosis, un parámetro que ya había sido empleado anteriormente en vid (Phillips 1998; Van Niekerk et al. 2004). La información aportada por esta variable fue complementada con datos de otras como la mortalidad de plantas inoculadas y la presencia de chancros y fructificaciones en torno al punto de inoculación. Las vides que presentaban chancro se relacionaron significativamente con las mayores necrosis, al igual que aquellas que presentaban fructificaciones.

Las especies de Botryosphaeriaceae son conocidas por causar chancros y decaimiento en el hospedador (Michailides 1991; Sánchez-Hernández et al. 2002; Slippers et al. 2004), así como por fructificar sobre los tejidos muertos de brazos, troncos y restos de poda de vid (Larignon et al. 2001). Las seis especies ensayadas en nuestro experimento indujeron la formación de chancro, aunque en un porcentaje variable según la especie y el aislado inoculado, de igual forma que la producción de fructificaciones. Por último, el decaimiento externo fue apreciable en vides inoculadas con tres aislados de *N. parvum* y uno de *N. luteum*, que degeneró en un colapso rápido y muerte de algunos de los sarmientos inoculados en un plazo breve.

Las variedades de uva respondieron de forma diferente a las inoculaciones artificiales con las especies de Botryosphaeriaceae. Algunos sarmientos de la variedad Macabeo colapsaron cuando se inocularon con los aislados más virulentos de *N. parvum*. Sin embargo, la variedad Tempranillo resultó más sensible a la seca del sarmiento cuando se inoculó con *N. luteum*. Ambas variedades también respondieron de forma variable a la inoculación de distintos aislados de *Di. seriata* y *N. parvum*. La controversia entre la mortalidad de las plantas y la longitud de la necrosis mostrada por ambas variedades no nos permite afirmar que se den diferencias claras de susceptibilidad varietal.

Botryosphaeria dothidea no causó un decaimiento externo apreciable y tampoco provocó la muerte de ninguna de las plantas inoculadas. A nivel general, fue la especie que produjo un mayor porcentaje de plantas con chancro, un 81%. La longitud de las necrosis fue similar en ambas variedades de uva. La información que existe en la bibliografía es escasa; Phillips (1998) ensayó un aislado que causó necrosis menores a las obtenidas en nuestro caso y Van Niekerk et al. (2004) definieron *B. dothidea* como de escasa virulencia. Nuestros datos parecen coincidir con los de la bibliografía existente, lo que define a *B. dothidea* como un patógeno moderadamente virulento de la vid.

Ninguno de los cuatro aislados de *Di. seriata* provocó decaimiento o muerte de las plantas inoculadas. Esta especie presentó además una gran variabilidad entre aislados en cuanto a la formación de chancros, fructificaciones y longitud de las lesiones vasculares. La variabilidad intraespecífica en la virulencia de *Di. seriata* ya ha sido citada por otros autores (Van Niekerk et al. 2004; Savocchia et al. 2007), e incluso se han llegado a definir hasta cuatro grupos de virulencia para esta especie (Larignon et al. 2001). Phillips (2002), en base a las diferentes informaciones acerca de la patogenicidad de esta especie, llegó a sugerir la posibilidad de que *Di. seriata* pueda tratarse de un complejo de especies con diferentes grados de patogenicidad. En esta confusión, *Di. seriata* está definida desde especie patógena hasta saprofita. Por ejemplo, en varios países está relacionada con la enfermedad del BDA (Larignon y Dubos 2001; Auger et al. 2004) o con una gran variedad de síntomas de decaimiento (Van Niekerk et al. 2006). Sin embargo, en diversas pruebas de patogenicidad, algunos aislados de *Di. seriata* se mostraron como patógenos débiles (Van Niekerk et al. 2004; Savocchia et al. 2007) y en otros ensayos resultó no patogénica (Taylor et al. 2005). En nuestro estudio, las necrosis causadas por *Di. seriata* no parecen propias de un patógeno primario y confirmarían una virulencia reducida. Posiblemente la acción conjunta de varios hongos permita a estas especies aumentar su virulencia, lo que explicaría el alto porcentaje de aislamiento de *Di. seriata* como especie acompañante de otros hongos patógenos de madera. Según Taylor et al. (2005), quizá su naturaleza endofítica le permita colonizar tejidos vivos y actuar como patógeno latente en vides estresadas. La variabilidad intraespecífica también se ha observado en otros patógenos de vid.

Este es el caso de *Eutypa lata*, asociado con la eutipiosis, en el que se ha detectado una importante diversidad tanto patogénica como genotípica (Péros et al. 1997). Esta heterogeneidad genética también ha sido confirmada en *Di. seriata* (Jacobs y Rehner 1998). Hasta ahora la patogenicidad de esta especie permanece dudosa y se necesitarán estudios posteriores para dilucidar su papel en el decaimiento de la vid.

Dothiorella viticola tampoco produjo la muerte de ninguna de las plantas inoculadas. El aislado de *Do. viticola* empleado en las inoculaciones dio lugar a unos porcentajes bajos de plantas con chancro y fructificaciones. Igualmente, causó las lesiones internas más reducidas, con una longitud significativamente diferente a la del control tan sólo en la variedad Macabeo. Estos datos, junto con el hecho de que *Do. viticola* se encuentre habitualmente en campo sobre restos de poda, parecen sugerir que se trata de una especie saprofita o de un patógeno con una virulencia muy baja (Luque et al. 2005). Van Niekerk et al. (2004) obtuvieron unos resultados similares, observando lesiones necróticas apenas diferentes a las del control. Sin embargo, en otro ensayo llevado a cabo, los dos aislados de *Do. viticola* testados sí consiguieron diferenciarse significativamente del control (Úrbez-Torres et al. 2007). En este último ensayo, el reaislamiento de la especie fue del 100%, porcentaje muy superior al obtenido en nuestro estudio, que no nos permitió confirmar su persistencia en la planta transcurridos seis meses.

Neofusicoccum parvum combinó las necrosis más largas con altos porcentajes de fructificación, generación de chancros y decaimiento en planta. Las necrosis sectoriales observadas en nuestras inoculaciones artificiales son una lesión típica asociada a especies de la familia Botryosphaeriaceae (Van Niekerk et al. 2002). Por ello, se puede catalogar a *N. parvum* como una especie patógena de gran virulencia. Esta especie mostró una importante variabilidad intraespecífica en cuanto a la mortalidad y a la longitud de las necrosis generadas entre aislados. De las ocho especies testadas por Van Niekerk et al. (2004), *N. parvum* fue una de las que produjo las necrosis más severas. Según Phillips (2002), *N. parvum* se asocia con diversos síntomas de decaimiento en vid y su importante carácter patogénico hace que no pueda ser

desestimado su papel en el complejo de las enfermedades de madera. La virulencia mostrada por nuestros aislados corrobora la información bibliográfica y sólo su bajo porcentaje de aislamiento en campo hace que no adquiera un papel predominante en los viñedos catalanes.

Con respecto a *Neofusicoccum luteum*, nuestros resultados indican que al menos el aislado empleado es altamente virulento, produciendo la muerte de sarmientos y necrosis equiparables a las causadas por *N. parvum*. Savocchia et al. (2007) demostraron la potencialidad patogénica de esta especie, aunque para Van Niekerk et al. (2004) se mostró como un patógeno de reducida virulencia. Las referencias bibliográficas acerca de la patogenicidad de *N. luteum* son limitadas y, por tanto, será necesario realizar una investigación más profunda para saber si la virulencia de nuestro aislado es excepcional o si la variabilidad intraespecífica es reconocida por otros autores.

Neofusicoccum vitifusiforme causó necrosis de varios centímetros, similares a las observadas por Van Niekerk et al. (2004) en madera adulta. Según Van Niekerk et al. (2006) podría tratarse de un patógeno importante de viña, sin embargo, nuestros resultados la sitúan como una especie de moderada virulencia y no permiten confirmar esta observación. Además, el porcentaje de reaislamiento de esta especie fue uno de los más bajos, lo que no permite confirmar su persistencia en la planta transcurridos seis meses. Desgraciadamente, no existe más información bibliográfica de la patogenicidad de esta especie que la que fue descrita por Van Niekerk et al. (2004). Esta falta de datos se debe probablemente a la aparente limitada distribución de esta especie que, por el momento, se ha circunscrito a Sudáfrica y Cataluña.

Las seis especies de Botryosphaeriaceae ensayadas han mostrado un carácter patogénico variable, desde especies de reducida virulencia (*Do. viticola* y *N. vitifusiforme*) hasta patógenos muy virulentos (*N. luteum* y *N. parvum*), pasando por patógenos de virulencia moderada (*B. dothidea*). *Diplodia seriata* mostró una importante variabilidad intraespecífica, lo

que dificulta fijar el papel de esta especie como patógeno de vid. Los patógenos más virulentos ensayados en este estudio, *N. luteum* y *N. parvum*, pueden ser considerados potencialmente como patógenos primarios de vid. La virulencia de *B. dothidea* fue menor y podría catalogarse como un patógeno moderado, aunque, el empleo de un único aislado no permite confirmar la patogenicidad de esta especie sobre vid. Por último, *Do. viticola* y *N. vitifusiforme* mostraron una virulencia aún más débil y podrían ser catalogadas como especies saprofitas.

Aunque la patogenicidad y virulencia de las especies de Botryosphaeriaceae que aparecen en vid no está perfectamente definida en algunos casos, se ha descrito una gran diversidad de síntomas causados por estas especies en vides de todo el mundo (Van Niekerk et al. 2006). Por tanto, parece que estas especies juegan un papel importante, a nivel mundial, en las enfermedades de madera de la vid.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1969). Plant Pathology. APS Press, New York (EE.UU.). 629 pp.
- Auger, J., Esterio, M., Ricke, G. y Pérez, I. (2004). Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 93.
- Barr, M. E. (1972). Preliminary studies on the *Dothideales* in temperate North America. *Contributions to the University of Michigan Herbarium* 9, 523-638.
- Denman, S., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Slippers, B., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2003). Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 95, 294-307.
- Fourie, P. y Halleen, F. (2001). Diagnosis of fungal diseases and their involvement in dieback diseases of young vines. *Winelands* 12, 19-23.
- Hoagland, D. y Aron, D. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347. Berkeley (EE.UU.). 32 pp.
- Jacobs, K. A. y Rehner, S. A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90, 601-610.
- Johnston, A. y Booth, C., Eds. (1983). Plant pathologist's pocketbook. Second edition. Commonwealth Agricultural Bureaux. Slough (Gran Bretaña). 439 pp.
- Larignon, P. y Dubos, B. (2001). Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 538, 26-29.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. y Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S336-S342.
- Luque, J., Martos, S. y Phillips, A. J. L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp nov on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111-1121.

- Michaelides, T. J. (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81, 566-573.
- Pascoe, I. (1998). Trunk diseases of grapevines-perspectives from a tour of California. *The Australian Grapegrower & Winemaker* 417, 68-71.
- Péros, J. P. y Berger, G. (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa* dieback. *Plant Pathology* 14, 515-523.
- Péros, J. P., Berger, G. y Lahogue, F. (1997). Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopathology* 87, 799-806.
- Phillips, A. J. L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excorioso and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327-332.
- Phillips, A. J. L. (2000). Excorioso, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 341-356.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3-18.
- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge (Gran Bretaña). 537 pp.
- Sánchez-Hernández, ME., Gutiérrez-García, J. y Trapero-Casas, A. (2002). *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathology* 51, 365-373.
- Savocchia, S., Steel, C. C., Stodart, B. J. y Somers, A. (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46, 27-32.
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83-101.
- Smith, H., Wingfield, M. J., Crous, P. W. y Coutinho, T. A. (1996). *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* in *Pinus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62, 86-88.
- Taylor, A., Hardy, G. E. S. J., Wood, P. y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187-195.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. y Luque, J. (2007). First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91, 772.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Groenewald J. Z. y Halleen, F. (2002). Botryosphaeria canker and dieback of grapevines. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers*.
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0902botryo.php3>
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W. Groenewald J. Z., Fourie, P. H. y Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.
- Van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F. y Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S43-S54.

SUSCEPTIBILIDAD DE DIVERSAS VARIEDADES Y PORTAINJERTOS DE VID FRENTE A DISTINTAS ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE

5.1	INTRODUCCIÓN	132
5.2	MATERIAL Y MÉTODOS	133
	5.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos	133
	5.2.2 Pruebas de patogenicidad	134
	5.2.3 Análisis de datos	135
5.3	RESULTADOS	135
	5.3.1 Seca del sarmiento	136
	5.3.2 Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos	139
	5.3.3 Necrosis vasculares	142
5.4	DISCUSIÓN	146
5.5	BIBLIOGRAFÍA	149

RESUMEN

Se ha evaluado la susceptibilidad de distintos portainjertos y variedades de uva frente a hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae, mediante diversas inoculaciones artificiales en invernadero. Para ello, se seleccionaron variedades ampliamente distribuidas en Cataluña; los portainjertos, 41B, 140Ru, 110R y SO4, las variedades de uva blanca, Macabeo, Parellada y Xarel·lo y las variedades de uva tinta, Cabernet-Sauvignon, Garnacha y Tempranillo. Los resultados mostraron que variedades y patrones presentan una susceptibilidad diferenciada a los distintos patógenos ensayados. Los hongos patógenos también demostraron distintos niveles de virulencia. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* fueron las especies más virulentas, ya que causaron la muerte de algunos sarmientos inoculados, aunque siempre entre las variedades y en ningún caso entre los portainjertos. En general, Ru140 fue el menos susceptible de los patrones mientras que 41B fue el más susceptible a las dos especies más virulentas. Las variedades de uva tinta mostraron un mayor porcentaje de chancros; sin embargo, para las lesiones vasculares no hubo un comportamiento diferenciado entre variedades tintas y blancas. Globalmente, los tamaños de las lesiones fueron muy similares entre las seis variedades ensayadas, aunque Garnacha fue más sensible a *N. luteum* y Macabeo a *N. parvum*.

5.1 INTRODUCCIÓN

En cada zona vitícola, se han ido incluyendo, a lo largo del tiempo, variedades foráneas que han contribuido a enriquecer el cultivo de la vid. Según distintas estimaciones, el número de variedades de vid cultivadas en el mundo se situaría entre 7.000 y 10.000 (Chomé 2002). A pesar de esta enorme diversidad, tan sólo un pequeño número de ellas tiene importancia comercial (Baleiras-Couto y Eiras-Dias 2006). En España, y según datos del "Registro de Variedades Comerciales de Vid" (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), están inscritas 84 variedades de uva de forma definitiva y otras 124 lo están provisionalmente. En cuanto a los portainjertos, aparecen 13 variedades definitivas y 11 más provisionales (Chomé 2002).

La caracterización de variedades de *Vitis vinifera* se realiza fundamentalmente mediante métodos ampelográficos, aunque se requieren numerosas observaciones en diferentes estados vegetativos y durante varios años (Chomé 2002). Otros métodos complementarios para la caracterización de variedades son la morfología de diferentes órganos y el análisis de aminoácidos (Royo et al. 1997; Asensio et al. 2002). En los últimos años, se han incorporado además los métodos moleculares que ofrecen mayor rapidez y fiabilidad, al no verse afectados por el estado fenológico ni por el grado de desarrollo de la planta. Por ejemplo, el uso de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) y/o microsatélites ha permitido la caracterización de un elevado número de variedades empleando vides procedentes de bancos de germoplasma (Moreno et al. 1995; Ulanovsky et al. 2002).

Para el desarrollo de la viticultura es necesario conocer las características agronómicas de las variedades de vid, entre ellas la facilidad de cultivo, la adaptación al medio, la compatibilidad portainjerto/vid y la resistencia a parásitos (Chomé 2002). Por ello, algunos estudios comparativos han ido dirigidos a conocer la resistencia varietal frente a la sequía (Galet 1988), ya que la escasez de agua puede comprometer seriamente la producción vitícola (Braun y Schmid 1999). Otros trabajos se han encaminado hacia la obtención de vides que

ofrezcan cierta resistencia frente a patógenos como el oidio (*Uncinula necator*) y/o el mildiu (*Plasmopara viticola*), que causan grandes pérdidas en la producción. Sin embargo, y a pesar de la importancia de las enfermedades de madera de la vid, hay pocos estudios que comparen la susceptibilidad de diferentes variedades de vid frente a los hongos causantes de estas enfermedades. Con el fin de evaluar la susceptibilidad de distintos portainjertos y variedades de uva frente a patógenos de madera de la vid, se llevaron a cabo diversas inoculaciones controladas con seis especies de Botryosphaeriaceae (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme*). Para ello, se seleccionaron cuatro variedades de portainjerto (41B, 140Ru, R110 y SO4) y seis variedades de uva (Macabeo, Parellada, Xarel·lo, Cabernet-Sauvignon, Garnacha tinta y Tempranillo), todas ellas ampliamente distribuidas en el territorio catalán.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos

En este ensayo se escogieron portainjertos y variedades de vid de uso común en Cataluña. Las variedades de portainjertos seleccionadas fueron 41B, 140Ru, R110 y SO4. Para las variedades de uva, se emplearon las variedades de uva blanca, Macabeo, Parellada y Xarel·lo y las de uva tinta, Cabernet-Sauvignon, Garnacha tinta y Tempranillo. Las plantas de vid, de un año de edad y procedentes de los viveros de Bodegas Miguel Torres, se transplantaron a principios del mes de abril de 2005. Se emplearon macetas de 3 litros y se utilizó como sustrato arena de sílice y turba (Floragard Floratorf, Oldenburg, Alemania), en proporción 5:1 (v:v). Las vides se mantuvieron en un invernadero dotado de riego por goteo automatizado y de un sistema de refrigeración *cooling*. En el invernadero, las vides de las diferentes variedades se distribuyeron aleatoriamente y se mantuvieron en condiciones de riego favorable para evitar la aparición de estrés hídrico. Las viñas se fertilizaron semanalmente con 10 ml de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Aaron 1950), con la proporción de macro y micronutrientes especificada en el capítulo 4.

Para esta prueba de susceptibilidad varietal, se seleccionaron seis aislados pertenecientes a otras tantas especies de Botryosphaeriaceae. Los aislados escogidos fueron *Botryosphaeria dothidea* (CBS 121484), *Diplodia seriata* (CBS 121485), *Dothiorella viticola* (CBS 117006), *Neofusicoccum luteum* (CBS 121482), *N. parvum* (CBS 121486) y *N. vitifusiforme* (CBS121481). En la Tabla Anexo 2 aparece la información detallada de los seis aislados empleados en el ensayo. Los inóculos se prepararon a partir de fragmentos de micelio de los aislados, incubados a 25° C en PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) y durante un máximo de 7 días antes de la inoculación.

5.2.2 Pruebas de patogenicidad

El estudio de la susceptibilidad de las diferentes variedades se llevó a cabo mediante inoculaciones controladas siguiendo los postulados de Koch (Agrios 1969). Las inoculaciones se realizaron a finales de mayo de 2005, siguiendo la misma metodología de inoculación descrita en capítulos anteriores. Para ello, se practicó una incisión sobre el material vegetal y, en el corte, se dispuso como inóculo un fragmento de micelio de una colonia del hongo de unos 2,5 mm, y se selló con Parafilm ® (Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, EE.UU.) Las variedades de vid se inocularon en el sarmiento del propio año y los portainjertos, por su parte, se inocularon en madera, aproximadamente a 10 cm del injerto y a 10 cm de la base. Para los controles se utilizaron fragmentos de PDA estéril de idéntico tamaño, utilizando la misma técnica de inoculación. El número de réplicas empleadas fue de 10 por cada variedad y aislado, así como en los controles.

Durante el primer mes tras la inoculación, se realizó un seguimiento diario de las plantas inoculadas para detectar la posible muerte o seca de la planta. Cuando esto ocurrió, y para evitar la posterior colonización por hongos saprofitos, se procedió a la lectura de todos los ejemplares de la variedad inoculada con el hongo responsable del colapso. La recogida de datos se realizó transcurridas dos semanas desde la muerte del último ejemplar. Por su parte, la lectura de las variedades que no sufrieron bajas se realizó a los seis meses de la inoculación.

Para evaluar la susceptibilidad de las variedades de vid empleadas, se anotaron síntomas externos e internos de cada planta. A nivel externo se observó la formación de chancro en el punto de inoculación, la aparición de fructificaciones en torno a la herida y, a nivel interno, se midió la longitud de las necrosis vasculares por encima y por debajo del punto de inoculación. Para medir las lesiones internas, se eliminó la corteza y los tejidos subyacentes con ayuda de un bisturí y se anotó la longitud de la zona necrótica. Finalmente, se tomaron fragmentos de los tejidos afectados para reaislar el hongo inoculado y completar así los postulados de Koch. La metodología empleada en los reaislamientos fue la descrita en el capítulo 4.

5.2.3 Análisis de datos

Una vez recopilados los datos, se analizaron estadísticamente con el programa Statistica versión 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). El estudio de las relaciones de dependencia entre las variables discretas (formación de chancro y aparición de fructificaciones) y los factores (variedad de viña y especie fúngica) se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos de la variable continua (longitud de la necrosis vascular) se transformaron previamente para la obtención de una distribución normal con homogeneidad de varianzas (Quinn y Keough 2002). En el caso de los portainjertos, se realizó una transformación logarítmica y para las variedades de uva, se aplicó la transformación de la raíz cuadrada. Cumplidos los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas, la longitud de la necrosis se analizó mediante un ANOVA de dos factores (variedad de vid o portainjerto y especie de Botryosphaeriaceae). Tras el ANOVA, se aplicó el test de Dunnett que identifica los aislados con necrosis significativamente mayores a las del control y el test de Tukey para detectar las diferencias significativas para los distintos hongos dentro de cada variedad.

5.3 **RESULTADOS**

La susceptibilidad mostrada por los portainjertos y por las variedades de uva frente a las seis especies de Botryosphaeriaceae se resume en las Tablas 5.1 y 5.2, respectivamente.

Las plantas control mostraron heridas bien cicatrizadas, y en ninguna de ellas se observó la formación de chancros ni la producción de cuerpos fructíferos en torno al punto de inoculación. Las necrosis vasculares medias de dichas plantas no superaron el centímetro de longitud aunque, en los reaslamientos en portainjerto, se detectaron algunas contaminaciones con especies de Botryosphaeriaceae, la más importante de ellas en 41B ([Tabla 5.1](#)).

5.3.1 Seca del sarmiento

Entre los portainjertos, las especies de Botryosphaeriaceae ensayadas no causaron la muerte o seca del sarmiento de ningún ejemplar ([Tabla 5.1](#)). Sin embargo, entre las variedades de uva, las especies *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* causaron bajas en todas ellas aunque el número de plantas afectadas varió según la variedad inoculada ([Tabla 5.2](#)). Transcurridos 7 días de la inoculación, las lesiones internas habían adquirido un desarrollo tal que llegaron a hacerse visibles externamente ([Figura 5.1a](#)). Tras el colapso o muerte de la parte aérea, se produjo, en todas las plantas afectadas, el rebrote del sarmiento por debajo del punto de inoculación ([Figura 5.1b](#)).



Figura 5.1 Síntomas observados en plantas de la variedad Macabeo inoculadas con *Neofusicoccum luteum*. Necrosis visible a los 7 días de la inoculación **(a)** y seca del sarmiento inoculado y rebrote por debajo del punto de inoculación **(b)**.

Tabla 5.1 Resultados de las pruebas de patogenicidad de distintas especies de Botryosphaeriaceae sobre los diferentes portainjertos de vid. Los valores expresan el promedio sobre diez ejemplares inoculados en cada caso.

Especie	Código CBS	41B						140Ru					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reisl.
Control		0	0	0	0,5	f	50	0	0	0	0,1	d	10
<i>B. dothidea</i>	121484	0	10	0	2,2	cd	100	0	8	1	2,5	b	78
<i>Di. seriata</i>	121485	0	10	1	3,1	bc	100	0	10	1	2,3	b	90
<i>Do. viticola</i>	117006	0	6	0	1,0	e	80	0	1	0	0,8	c	11
<i>N. luteum</i>	121482	0	7	7	12,6	a	100	0	7	4	5,5	a	75
<i>N. parvum</i>	121486	0	10	6	20,3	a	100	0	8	10	9,3	a	100
<i>N. vitifusiforme</i>	121481	0	6	1	1,4	de	88	0	1	0	0,9	c	100

Especie	Código CBS	R110						S04					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reisl.
Control		0	2	0	0,4	e	10	0	0	0	0,6	d	0
<i>B. dothidea</i>	121484	0	10	0	6,5	ab	70	0	7	2	4,3	b	90
<i>Di. seriata</i>	121485	0	9	3	5,4	bc	100	0	9	4	3,4	b	78
<i>Do. viticola</i>	117006	0	3	0	1,5	d	30	0	1	0	1,3	c	40
<i>N. luteum</i>	121482	0	5	0	9,2	a	100	0	2	7	9,2	a	100
<i>N. parvum</i>	121486	0	10	6	11,1	a	100	0	9	10	12,7	a	100
<i>N. vitifusiforme</i>	121481	0	2	0	1,3	d	100	0	2	2	2,3	bc	90

Muertas: Número de plantas que presentaron el tallo inoculado muerto o seco.

Chancro: Número de plantas en las que se formó un chancro en el punto de inoculación.

Fructificaciones (Fruct.): Número de plantas en las que aparecieron fructificaciones en torno al punto de inoculación.

Longitud de la necrosis (Necr.): Longitud de la necrosis vascular desde el punto de inoculación (en cm). En negrita, necrosis significativamente distintas al control según el test de Dunnett.

Significación (Sig.): Rangos de significación comparando los diferentes hongos inoculados para un hospedador concreto según el test de Tukey.

Porcentaje de reislamiento (% Reisl.): Porcentaje de reislamiento de la especie inoculada a partir de la madera infectada.

Tabla 5.2 Resultados de las pruebas de patogenicidad de distintas especies de Botryosphaeriaceae sobre las diferentes variedades de uva. Los valores expresan el promedio sobre diez ejemplares inoculados en cada caso.

Especie	Código CBS	Macabeo						Parellada						Xarel·lo					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.
Control		0	0	0	0,2	d	0	0	0	0	0,1	e	0	0	0	0	0,5	f	0
<i>B. dothidea</i>	121484	0	5	2	1,7	c	100	0	2	5	1,3	cd	100	0	2	2	1,5	de	100
<i>Di. seriata</i>	121485	0	3	1	1,5	c	70	0	2	9	1,5	cd	80	0	2	6	1,6	cd	100
<i>Do. viticola</i>	117006	0	3	0	1,7	c	80	0	0	2	0,4	d	70	0	0	4	0,4	ef	44
<i>N. luteum</i>	121482 ^a	3	5	10	8,6	a	100	3	6	9	9,3	a	100	4	5	8	7,0	a	100
<i>N. parvum</i>	121486 ^a	1	5	7	8,3	b	100	2	4	8	5,5	ab	100	4	3	6	4,7	ab	100
<i>N. vitifusiforme</i>	121481	0	2	0	1,8	c	100	0	1	8	1,5	cd	100	0	2	7	2,0	cd	100
Especie	Código CBS	Cabernet-Sauvignon						Garnacha Tinta						Tempranillo					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.
Control		0	0	0	0,0	f	0	0	0	0	0,1	e	0	0	0	0	0,7	ef	0
<i>B. dothidea</i>	121484	0	1	6	0,8	e	90	0	3	4	1,1	cde	100	0	8	5	1,7	d	100
<i>Di. seriata</i>	121485	0	7	1	1,8	cd	70	0	10	4	2,4	bc	100	0	5	0	1,5	d	70
<i>Do. viticola</i>	117006	0	5	0	1,4	de	50	0	3	0	0,8	de	30	0	3	5	0,2	f	80
<i>N. luteum</i>	121482 ^a	4	10	8	6,2	a	90	7	10	10	9,5	a	100	6	10	10	8,2	a	100
<i>N. parvum</i>	121486 ^a	1	8	9	3,9	ab	100	1	7	5	7,1	a	100	1	6	10	5,5	ab	100
<i>N. vitifusiforme</i>	121481	0	1	5	3,3	bc	100	0	1	0	1,5	bcd	100	0	7	8	2,5	cd	100

^a Para estos patógenos, los resultados se leyeron al mes de la inoculación.

Muertas: Número de plantas que presentaron el tallo inoculado muerto o seco.

Chancro: Número de plantas en las que se formó un chancro en el punto de inoculación.

Fructificaciones (Fruct.): Número de plantas en las que aparecieron fructificaciones en torno al punto de inoculación.

Longitud de la necrosis (Necr.): Longitud de la necrosis vascular desde el punto de inoculación (en cm). En negrita, necrosis significativamente distintas al control según el test de Dunnett.

Significación (Sig.): Rangos de significación comparando los diferentes hongos inoculados para un hospedador concreto según el test de Tukey.

Porcentaje de reaislamiento (% Reaisl.): Porcentaje de reaislamiento de la especie inoculada a partir de la madera infectada.

El patógeno que causó mayor mortalidad fue *N. luteum*, en el 41% de las plantas inoculadas, seguido de *N. parvum*, con un 17%. *Neofusicoccum luteum* causó una mortalidad media de entre el 30 y el 40% en las distintas variedades, excepto en Xarel·lo y Garnacha tinta, que fue del 44% y 60%, respectivamente. Por su parte, *N. parvum* causó una mortalidad media de entre el 10 y el 20%, salvo en Xarel·lo, que ascendió hasta el 44%. Diferenciando por el tipo de uva (blanca y tinta), la mortalidad fue muy similar, 30% en blancas y 28% en tintas; segregando a la vez por especie, *N. luteum* causó el 47% de mortalidad en las variedades tintas, que desciende hasta el 35% en blancas. Las plantas afectadas de colapso mostraron necrosis vasculares muy evidentes a pesar de que la lectura se produjo tan sólo un mes después de la inoculación. De estas plantas colapsadas, se realsó el hongo inoculado en un porcentaje que osciló entre el 90 y el 100% de los casos (Tabla 5.2).

5.3.2 Formación de chancros y producción de cuerpos fructíferos

a) Portainjertos

La formación de chancros varió significativamente en función de la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$). El 100% de las plantas inoculadas con *Di. seriata*, presentaron chancro, el 93% de las inoculadas con *N. parvum*, el 90% con *B. dothidea*, el 57% con *N. luteum*, el 30% con *N. vitifusiforme* y, por último, el 28% de las inoculadas con *Do. viticola* (Figura 5.2). Según el análisis estadístico, la formación de chancros también dependió de la variedad de portainjerto inoculada ($p < 0,01$). El portainjerto 41B mostró chancros en el 84% de las plantas, seguido de R110 y 140Ru, con el 67% y el 63% respectivamente, y, por último, el portainjerto SO4, con chancros en el 52% de la plantas.

La producción de cuerpos fructíferos dependió significativamente de la especie inoculada ($p < 0,01$). Las especies que más fructificaron fueron *N. parvum* y *N. luteum*, en el 80% y el 49% de las plantas inoculadas, respectivamente, seguidas por *Di. seriata* (24%) (Figura 5.3). *Neofusicoccum vitifusiforme* y *B. dothidea* fructificaron en el 8% de las plantas y *Do. viticola* no llegó a formar cuerpos fructíferos en ninguna de ellas. La variedad de portainjerto también influyó significativamente en la producción de cuerpos fructíferos

($p = 0,02$). Por ejemplo, en la variedad SO4, el 42% de las plantas presentaron fructificaciones mientras que las otras tres variedades oscilaron entre el 16 y el 29%.

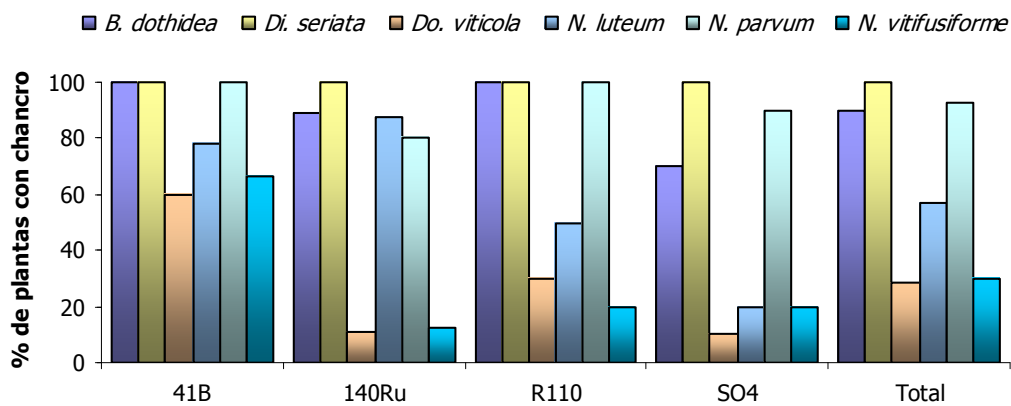


Figura 5.2 Porcentaje de chancros producidos por las seis especies de Botryosphaeriaceae inoculadas en los cuatro portainjertos (41B, 140Ru, R110 y SO4) y porcentaje medio de todos los portainjertos para cada especie de Botryosphaeriaceae.

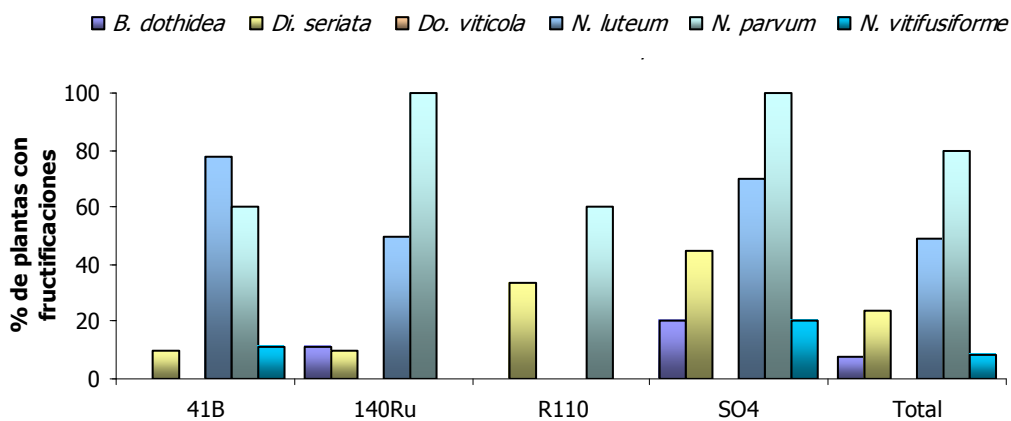


Figura 5.3 Porcentaje de fructificaciones producidas por las seis especies de Botryosphaeriaceae inoculadas en los cuatro portainjertos (41B, 140Ru, R110 y SO4) y porcentaje medio de todos los portainjertos para cada especie de Botryosphaeriaceae.

b) *Variedades de uva*

La formación de chancros se vio afectada por la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$). En general, en las variedades de uva se observaron porcentajes de chancro menores que para los portainjertos. *Neofusicoccum luteum* generó chancros en el 78% de las plantas inoculadas, seguido de *N. parvum* con el 56%, *Di. seriata* con el 49%, *B. dothidea* con el 36% y, por último, *Do. viticola* y *N. vitifusiforme*, ambas con el 24% (Figura 5.4). Según el análisis estadístico, la formación de chancros dependió además de la variedad de uva inoculada ($p < 0,01$). Las variedades de uva tinta mostraron significativamente una mayor proporción de chancros que las variedades blancas ($p < 0,01$). De entre las tintas, la variedad que más chancros mostró fue Tempranillo (65%), seguida de Garnacha tinta (57%) y Cabernet-Sauvignon (53%). Con referencia a las variedades blancas, la formación de chancros se dio en los siguientes porcentajes: 38% para Macabeo, 26% para Xarel·lo y 25% para Parellada.

La formación de estructuras reproductoras dependió significativamente de la especie inoculada ($p < 0,01$). Las especies que más fructificaron fueron *N. luteum* y *N. parvum*, en el 86% y el 63% de las plantas inoculadas, respectivamente (Figura 5.5). El resto de especies fructificaron con porcentajes que variaron entre el 39% y el 19%. También la variedad de uva influyó significativamente en la producción de cuerpos fructíferos ($p < 0,01$). Sin embargo, en este caso no hubo diferencias significativas entre las fructificaciones de variedades tintas y blancas ($p = 0,55$). La variedad Parellada presentó el mayor porcentaje de plantas con fructificaciones fúngicas (68%). A continuación se encuentra la variedad Tempranillo, con el 63% de fructificaciones y Xarel·lo con el 61%. Las tres variedades restantes presentaron valores que oscilaron entre el 48% y el 33% (Figura 5.5).

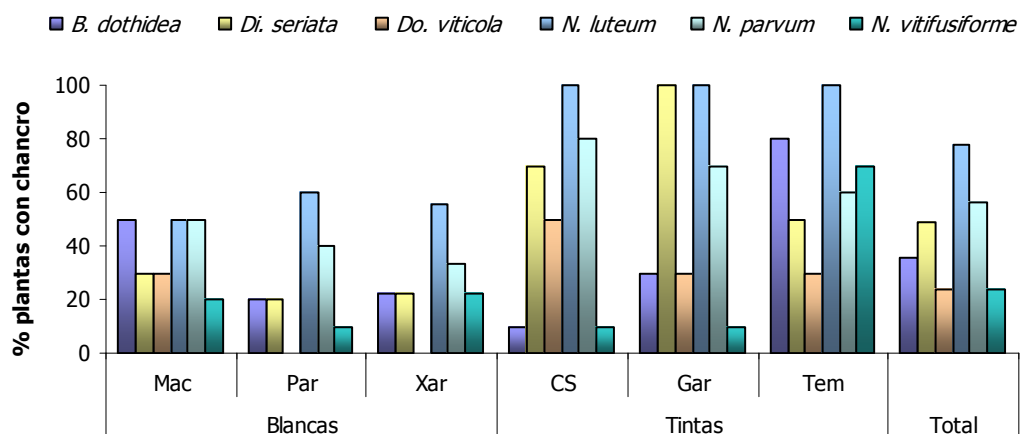


Figura 5.4 Porcentaje de chancros producidos por las seis especies de Botryosphaeriaceae inoculadas en seis variedades de uva (Macabeo (Mac), Parellada (Par), Xarel·lo (Xar), Cabernet-Sauvignon (CS), Garnacha tinta (Gar) y Tempranillo (Tem)) y porcentaje medio de todas las variedades para cada especie de Botryosphaeriaceae.

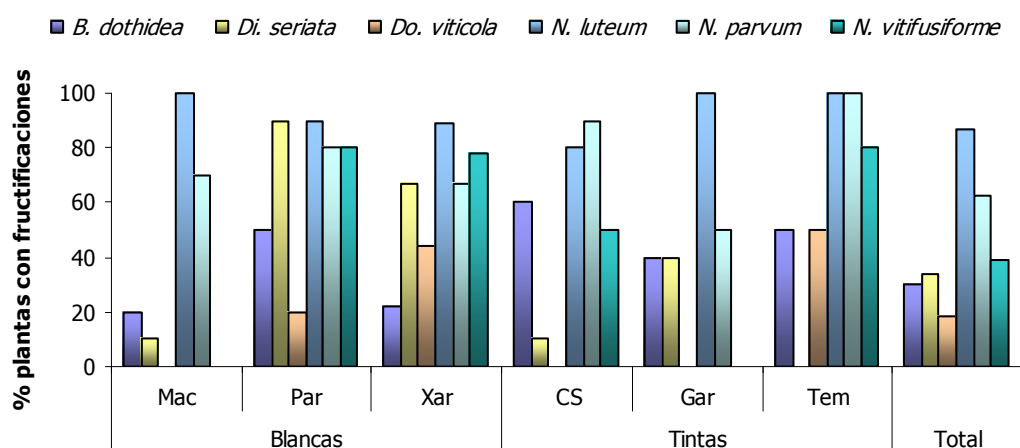


Figura 5.5 Porcentaje de fructificaciones producidas por las seis especies de Botryosphaeriaceae inoculadas en seis variedades de uva (Macabeo (Mac), Parellada (Par), Xarel·lo (Xar), Cabernet-Sauvignon (CS), Garnacha tinta (Gar) y Tempranillo (Tem)) y porcentaje medio de todas las variedades para cada especie de Botryosphaeriaceae.

5.3.3 Necrosis vasculares

a) *Portainjertos*

La variedad inoculada influyó de forma significativa en la longitud de las necrosis formadas en los portainjertos ($p < 0,01$) (Tabla 5.3; Figura 5.6a). Los portainjertos 41B, SO4 y R110 mostraron necrosis de unos 6 cm de media mientras que el portainjerto 140Ru tuvo necrosis de 3,5 cm de media. También las dimensiones de las necrosis variaron

Tabla 5.3 Resultado del ANOVA multifactorial para el análisis de la longitud de la necrosis según las variedades de portainjerto inoculadas con distintas especies de Botryosphaeriaceae. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
Especie de Botryosphaeriaceae	6	266,67	< 0,01
Variedad de portainjerto	3	21,98	< 0,01
Especie * Variedad	18	3,30	< 0,01

significativamente según la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$) (Tabla 5.3; Figura 5.6b). Los patógenos *N. parvum* y *N. luteum* dieron lugar a las necrosis mayores, a pesar de que las vides sólo estuvieron un mes inoculadas. Las lesiones causadas por las especies *N. luteum* y *N. parvum* fueron, en comparación con el resto, de mayor longitud e intensidad de color aunque no llegaron a formar necrosis sectoriales. A continuación se encuentran *B. dothidea* y *Di. seriata*, con necrosis de 3,9 y 3,5 cm, respectivamente. De menor longitud aparecen las necrosis de *N. vitifusiforme* y *Do. viticola* de 1,5 y 1,1 cm de media, de forma respectiva.

También resultó significativa la interacción entre la especie fúngica inoculada y la variedad de portainjerto ($p < 0,01$) (Tabla 5.3; Figura 5.7). En las cuatro variedades, *N. parvum* y *N. luteum* causaron las lesiones mayores. El portainjerto más sensible a estos dos patógenos

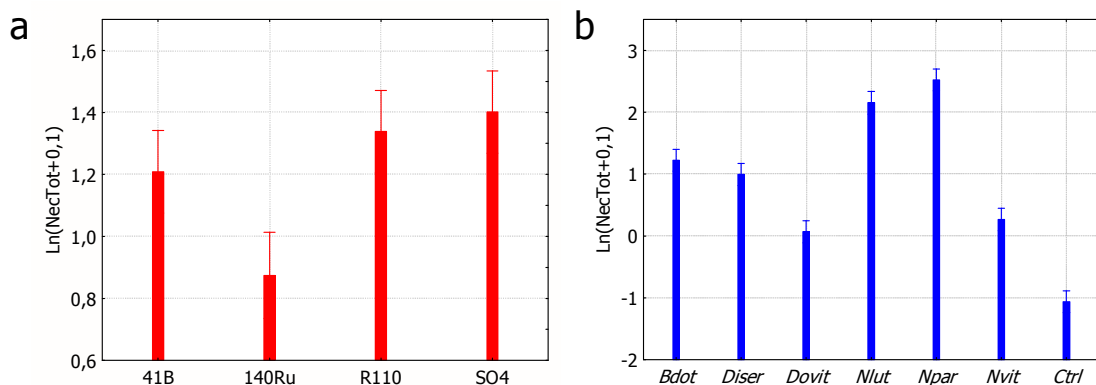


Figura 5.6 Longitud media de las necrosis vasculares (variable transformada mediante logaritmo) generadas por las especies de Botryosphaeriaceae en las cuatro variedades de portainjerto (a). Longitud media de las necrosis generadas por cada una de las seis especies de Botryosphaeriaceae sobre portainjerto (b). Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

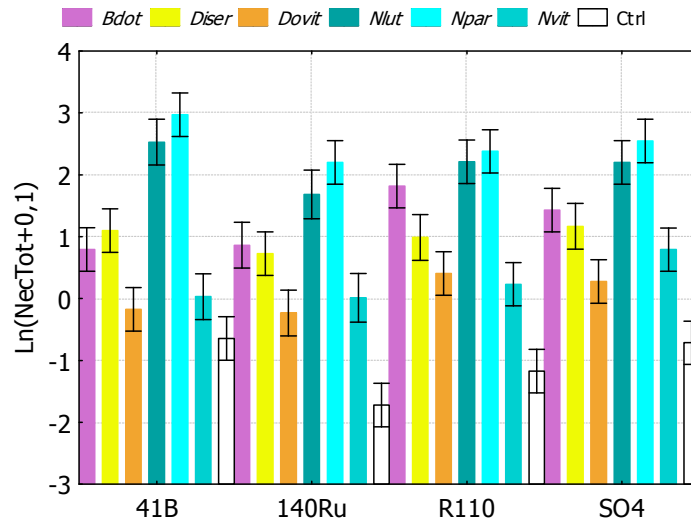


Figura 5.7 Longitud de las necrosis (variable transformada mediante logaritmo) detallada para cada una de las seis especies de Botryosphaeriaceae y las cuatro variedades de portainjerto. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

fue 41B. Según el test de Dunnett, todas las especies de Botryosphaeriaceae ensayadas formaron necrosis significativamente diferentes al control para los diferentes portainjertos (Tabla 5.1). El portainjerto R110 fue el que mostró las mayores necrosis para *B. dothidea*, *Di. seriata* y *Do. viticola*. Por último, la especie *N. vitifusiforme* generó la mayor necrosis media en SO4.

b) Variedades de uva

Las variedades de uva no influyeron de forma significativa en la longitud de la necrosis, ni de forma individual, ni agrupando por el tipo de uva ($p = 0,75$ y $p = 0,31$, respectivamente) (Tabla 5.4; Figura 5.8a). Las longitudes oscilaron entre los 3,9 cm de Macabeo, y los 2,9 cm de Xarel·lo y Cabernet-Sauvignon. Sin embargo, la especie de Botryosphaeriaceae inoculada sí afectó significativamente a la longitud de la necrosis ($p < 0,01$) (Tabla 5.4; Figura 5.8b). En este caso *N. luteum* formó las mayores lesiones internas (8,1 cm), seguido de *N. parvum* (5,8 cm). Estas necrosis fueron de color marrón intenso con formación de necrosis sectoriales que, en ocasiones, llegaron a provocar el colapso del sarmiento inoculado. A continuación se encuentran *N. vitifusiforme*, con lesiones de 2,1 cm de media,

seguido de *Di. seriata* (1,7 cm) y *B. dothidea* (1,3 cm) y, ya por último, de *Do. viticola*, con necrosis que no superaron el centímetro de longitud.

La interacción entre la especie de Botryosphaeriaceae inoculada y la variedad de uva fue significativa ($p < 0,01$) (Tabla 5.4). En la Figura 5.9 se observa que *N. luteum* y *N. parvum* formaron las necrosis más largas en cada una de las variedades. La variedad Cabernet-Sauvignon fue la que presentó las mayores necrosis para *N. vitifusiforme*, mientras que Garnacha fue la variedad más sensible para *Di. seriata*. Por su parte, *B. dothidea* mostró las mayores, e idénticas, longitudes de necrosis para Macabeo y Tempranillo. Según el test de Dunnett, *Do. viticola* fue la única especie que no formó necrosis significativamente diferentes al control en Parellada, Tempranillo y Xarel·lo, aunque mostró las mayores necrosis en Macabeo (Tabla 5.2).

Tabla 5.4 Resultado del ANOVA multifactorial para la longitud de la necrosis según las variedades de uva y el tipo de uva inoculados con distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
Especie de Botryosphaeriaceae	6	269,62	< 0,01
Variedad de uva	5	1,19	0,31
Especie * Variedad	30	0,72	< 0,01
Especie de Botryosphaeriaceae	6	210,63	< 0,01
Tipo de uva (blanca/tinta)	1	0,10	0,75
Especie * Tipo de uva	6	1,33	0,24

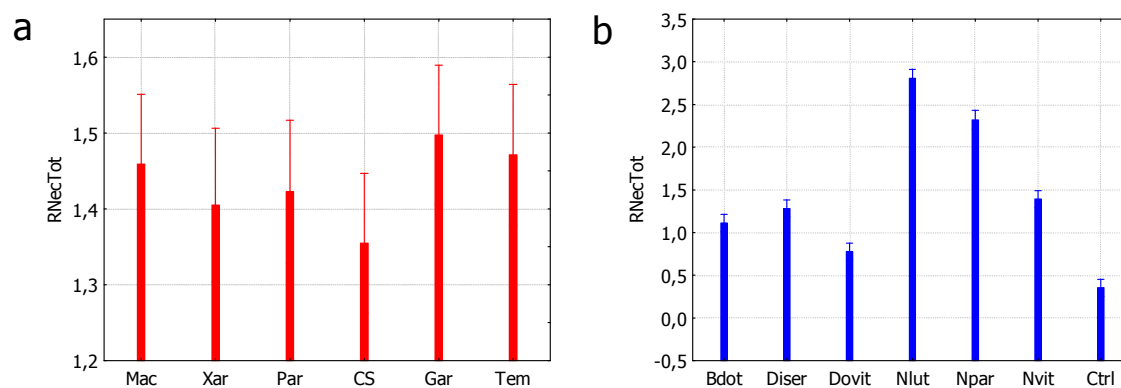


Figura 5.8 Longitud media de las necrosis vasculares (variable transformada mediante raíz) causadas por las especies de Botryosphaeriaceae en las seis variedades de vid: Macabeo (Mac), Xarel·lo (Xar), Parellada (Par), Cabernet-Sauvignon (CS), Garnacha tinta (Gar) y Tempranillo (Tem) **(a)**. Longitud media de las necrosis generadas por cada una de las seis especies de Botryosphaeriaceae sobre variedad de vid **(b)**. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

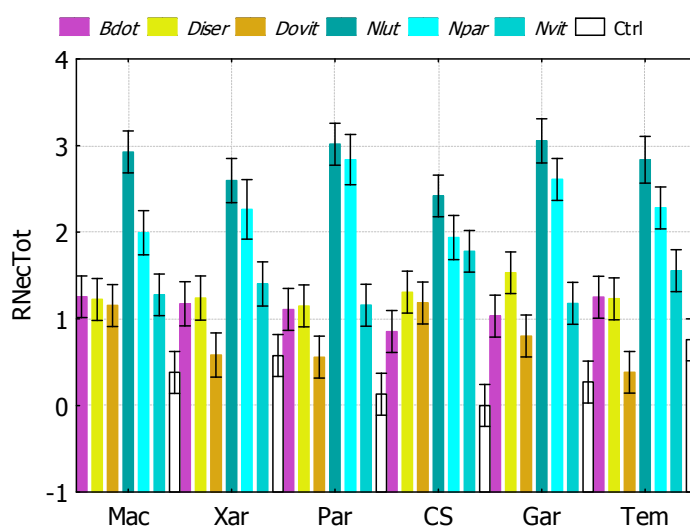


Figura 5.9 Longitud de las necrosis (variable transformada mediante raíz) detallada para cada una de las seis especies de Botryosphaeriaceae en las seis variedades de vid: Macabeo (Mac), Xarel·lo (Xar), Parellada (Par), Cabernet-Sauvignon (CS), Garnacha tinta (Gar) y Tempranillo (Tem). Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

5.4 DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos han mostrado que las variedades y los portainjertos estudiados presentaron una susceptibilidad diferenciada a las seis especies de Botryosphaeriaceae. La respuesta de los portainjertos a los distintos patógenos fue bastante

heterogénea pero, en general, Ru140 fue el menos susceptible y 41B presentó la mayor susceptibilidad a las especies más virulentas, *N. luteum* y *N. parvum*, mientras que R110 lo fue para *B. dothidea*, *Di. seriata* y *Do. viticola*. En cuanto a la susceptibilidad de las variedades de vid, las plantas de uva tinta mostraron un mayor porcentaje de chancros, aunque no hubo un comportamiento homogéneo en el porcentaje de fructificaciones y de lesiones vasculares. El cultivar Garnacha tinta mostró las mayores necrosis para *N. luteum* y Macabeo para *N. parvum*.

En un estudio de campo realizado en la región de La Toscana (Italia), el portainjerto Ru140 mostró uno de los porcentajes de incidencia de yesca más bajos de los cinco patrones analizados (Marchi 2001), comparable con los resultados obtenidos en nuestro estudio, lo que sugiere que este portainjerto puede ser relativamente tolerante a las enfermedades de madera de origen fúngico. La mayor resistencia de Ru140 frente a la sequía (Galet 1988) y su menor susceptibilidad a las especies de Botryosphaeriaceae, lo convertirían en un portainjerto bien adaptado a zonas de déficit hídrico y elevada incidencia de enfermedades de madera relacionadas con estos patógenos. En el ensayo de Marchi (2001), el patrón SO4 también mostró un bajo grado de incidencia de yesca y, en un estudio de campo llevado a cabo en Sudáfrica, se aisló *Phaeoconiella chlamydospora* en un menor porcentaje en las plantas madre de los portainjertos Richter (R99 y R110) en comparación con Rawsonville y 101-14 Mgt (Fourie y Halleen 2004). Sin embargo, según nuestros resultados, los patrones SO4 y R110 no dieron muestras claras de una menor susceptibilidad a las especies de Botryosphaeriaceae ensayadas.

En referencia a la sensibilidad varietal, Herlemont (2004) destacó que la variedad Cabernet-Sauvignon parecía presentar una mayor sensibilidad a la yesca y al BDA en Francia y, en menor medida, a la eutipiosis. Aunque estos datos parecen contradecir nuestros resultados, es importante señalar que la información recopilada por Herlemont (2004) procede de plantas de campo, bajo condiciones muy distintas a las de nuestro ensayo. En otro estudio, Sosnowski et al. (2007) analizaron la virulencia de varios aislados de *Eutypa lata* en plantas de 18 meses

de tres variedades de vid (Garnacha, Cabernet-Sauvignon y Merlot), observando que las plantas de Garnacha manifestaban síntomas más severos que las otras dos variedades y corroborando otros estudios que ya citaban la mayor sensibilidad de Garnacha (Carter 1991; Higuert y Wicks 1998). En nuestro ensayo se confirmó la susceptibilidad de esta variedad con tres de las seis especies de Botryosphaeriaceae ensayadas. En un ensayo de campo realizado en Italia con plantas de al menos 12 años de edad, la variedad de uva tuvo una influencia muy significativa en el nivel de incidencia de la yesca, con porcentajes que oscilaron desde el 9% de la menos susceptible (var. Roussanne) hasta el 64% en la más susceptible (var. Semillon) (Marchi 2001). Teniendo en cuenta que estos patógenos actúan de forma lenta e insidiosa en la planta, quizá la edad de la planta sea un factor importante a la hora de definir la susceptibilidad de las diferentes variedades.

Armengol et al. (2000) analizaron 59 muestras de vides afectadas procedentes de Cataluña, constatando la presencia de diversos hongos patógenos de madera en todas las variedades de uva de nuestro ensayo, a excepción de Tempranillo. Con estos datos no se pueden sacar conclusiones sobre la sensibilidad de las distintas variedades en Cataluña, aunque, a nivel general, el alto porcentaje de aislamiento de *Diplodia seriata* demuestra la susceptibilidad de todas las variedades a este patógeno.

Las diferentes especies de Botryosphaeriaceae empleadas demostraron distintos niveles de virulencia. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* fueron los patógenos más agresivos de todos los ensayados puesto que causaron la muerte del sarmiento de algunas de las plantas inoculadas, aunque siempre entre las variedades y en ningún caso entre los portainjertos. Las necrosis formadas por estos dos patógenos, las de mayor longitud pese a haber estado inoculadas tan sólo un mes, confirmaron su importante virulencia tanto en variedades como en portainjertos. Según la longitud de la necrosis, *Botryosphaeria dothidea* y *Di. seriata* mostraron una virulencia moderada, seguida de *Neofusicoccum vitifusiforme*. En este ensayo, destacó la escasa agresividad de *Dothiorella viticola*, que en algunas variedades no llegó a mostrar

lesiones mayores que el control. Estos resultados confirman los obtenidos en el ensayo de patogenicidad y virulencia realizado con estas mismas especies (ver capítulo 4).

Una selección previa de variedades que ofrezcan una cierta resistencia a enfermedades fúngicas permitirá reducir la aplicación de fungicidas en campo. Algunas investigaciones tienen como objetivo seleccionar variedades menos susceptibles a patógenos como el oidio (*Uncinula necator*) y/o el mildiu (*Plasmopara viticola*) (Boso et al. 2007; Gindro et al. 2007). Por ejemplo, la variedad tinta Regent (clon Gf. 67-198-3) se presenta como resistente a ambos (<http://www.bafz.de/baz2006 V4/index.php?id=455>). Tras la prohibición del arsenito sódico y sin un fungicida eficaz para el control de las enfermedades de madera, sería muy conveniente catalogar las variedades más susceptibles a estos patógenos.

A pesar de la importancia que tiene conocer la susceptibilidad de las diferentes variedades empleadas en un territorio a los patógenos de la madera, existe una notable falta de información al respecto. Sin embargo, conocer el grado de susceptibilidad varietal frente a determinados patógenos permitirá hacer un seguimiento o tratamiento especial a aquellos viñedos de variedades más susceptibles. Este estudio supone un avance en la caracterización de variedades ampliamente empleadas en una región vitícola como Cataluña. Para completar esta información, sería necesario realizar un estudio de campo que evalúe la susceptibilidad de vides adultas de estas variedades a las distintas especies de Botryosphaeriaceae.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1969). Plant Pathology. APS Press, New York (EE.UU.). 629 pp.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. y García-Jiménez, J. (2001). Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 27, 137-153.
- Asensio, M. L., Valdés, E. y Cabello, F. (2002). Characterisation of some Spanish white grapevine cultivars by morphology and amino acid analysis. *Scientia Horticulturae* 93, 289-299.
- Baleiras-Couto, M. M. y Eiras-Dias, J. E. (2006). Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Analytica Chimica Acta* 563, 283-291.

- Boso, S., Santiago, J. L. y Martínez, M. C. (2007). Influence of rootstock on resistance of *Vitis* cv. "Albariño" clones to downy mildew. *European Journal of Horticultural Science* 72, 179-185.
- Braun, P. y Schmid, J. (1999). Sap flow measurements in grapevines (*Vitis vinifera* L.) 1. Stem morphology and use of the heat balance method. *Plant and Soil* 215, 39-45.
- Carter, M. V. (1991). The status of *Eutypa lata* as a pathogen. Phytopathological Paper No. 32. International Mycological Institute, Surrey (Gran Bretaña).
- Chomé, P. M. (2002). Catálogo de variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Chomé, P. M. (Cord.). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica (Ed.). Madrid (España). 303 pp.
- Fourie, P. H. y Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313-315.
- Galet, P. (1988). Précis d'ampélographie pratique. Charles Dehan (Ed.). Montpellier (Francia). 256 pp.
- Gindro, K., Viret, O. y Spring, J. L. (2007). Development of methods to determine level of resistance to *Plasmopara viticola* for early selection in grapevine cultivars. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 39, 133-139.
- Herlemont, B. (2004). L'observatoire national des maladies du bois et la situation en France. Rencontre Technique: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées. Esca et BDA. Station Régionale ITV Midi-Pyrénées. 9 de décembre de 2004. Toulouse (Francia).
- Highet, A. y Wicks, T. (1998). The incidence of *Eutypa* dieback in South Australian vineyards. *Australian Grapegrower and Winemaker* 441a, 135-136.
- Hoagland, D. y Aron, D. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347. Berkeley (EE.UU.). 32 pp.
- Marchi, G. (2001). Susceptibility to esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 40, 27-36.
- Moreno, S., Gogorcena, Y. y Ortiz, J. M. (1995). The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 62, 237-243.
- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge (Gran Bretaña). 537 pp.
- Royo, J. B., Cabello, F., Miranda, S., Gogorcena, Y., Gonzalez, J., Moreno, S., Itoiz, R. y Ortiz, J. M. (1997). The use of isoenzymes in characterization of grapevines (*Vitis vinifera* L.). Influence of the environment and time of sampling. *Scientia Horticulturae* 69, 145-155.
- Sosnowski, M. R., Lardner, R., Wicks, T. J. y Scott, E. S. (2007). The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease* 91, 924-931.
- Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., Martínez de Toda, F. y Ortiz, J. M. (2002). Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 92, 241-254.

HUÉSPEDES ALTERNATIVOS DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE PROCEDENTES DE VID

6.1	INTRODUCCIÓN	152
6.2	MATERIAL Y MÉTODOS	153
6.2.1	Material vegetal y aislados fúngicos	153
6.2.2	Pruebas de patogenicidad	155
6.2.3	Análisis de datos	156
6.3	RESULTADOS	156
6.4	DISCUSIÓN	163
6.5	BIBLIOGRAFÍA	166

RESUMEN

La gran variedad de hospedadores que son colonizados por las especies de Botryosphaeriaceae es una característica frecuente en esta familia. El objetivo de este ensayo fue averiguar la susceptibilidad de especies vegetales agronómicas y naturales que cohabitan con los cultivos de vid, y conocer así su potencial como hospedadores alternativos de especies de Botryosphaeriaceae. Para ello se realizaron pruebas de patogenicidad con cuatro aislados procedentes de vid (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*) en nueve especies leñosas (almendro, avellano, encina, jara, melocotonero, nogal, olivo, pino y romero). Almendros, encinas, jaras, melocotoneros y nogales mostraron una gran susceptibilidad, mientras que olivos, pinos y romeros fueron menos sensibles. Las necrosis vasculares causadas por los diferentes patógenos fueron significativas en todas las especies excepto las observadas en pino por *Di. seriata* y en olivo por *B. dothidea* y *Di. seriata*. Además, los aislados *N. luteum* y *N. parvum* causaron la muerte del tallo inoculado en almendro, encina, jara, melocotonero y nogal. Los resultados sugieren que algunas de estas especies vegetales podrían actuar como huéspedes secundarios de Botryosphaeriaceae y, en caso de que hubiese infecciones cruzadas, estos patógenos resultarían además una amenaza tanto para las plantaciones de vid como para las especies leñosas acompañantes.

6.1 INTRODUCCIÓN

Las especies de Botryosphaeriaceae son conocidas por tener un amplio rango de hospedadores en su extensa distribución geográfica (Von Arx y Müller 1954). El hecho de que un patógeno pueda traspasar la barrera de la especificidad del hospedador indica que podría convertirse en un patógeno "emergente" (Woolhouse et al. 2005). El salto de hospedador es común en algunos patógenos fúngicos (Wingfield 2003). Así por ejemplo, algunos hongos que atacan eucaliptos introducidos en Sudáfrica se han aislado también en la vegetación local, como es el caso de "*Botryosphaeria eucalyptorum* Crous, H. Sm. ter & M.J. Wingf. (Smith et al. 2001). Por tanto, si eucaliptos y árboles locales de la misma familia se encuentran próximos, los patógenos podrían realizar infecciones cruzadas entre ambos grupos, dando lugar a una afección más severa (Burgess y Wingfield 2002). Según Anderson et al. (2004), los movimientos de material vegetal por causa antropogénica y los cambios climáticos que afectan negativamente a las plantas podrían favorecer la transferencia de patógenos entre distintos hospedadores vegetales.

Numerosas especies de Botryosphaeriaceae no son específicas de un único hospedador (Slippers y Wingfield 2007). Algunas especies, como *B. dothidea* y *Di. seriata*, se han descrito como importantes patógenos de frutales de hueso y pepita, causando pudriciones en el fruto, punteados en las hojas, chancros en el tallo y ramas, gomosis, decaimiento y, en algunos casos, mortalidad del árbol (Britton y Hendrix 1989; Britton et al. 1990; Pusey 1993; Parker y Sutton 1993; Brown-Rytlewski y McManus 2000). También se han aislados especies de Botryosphaeriaceae en especies típicas del bosque mediterráneo como *B. dothidea* en *Cistus ladanifer* L. y *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. ribis*, *Di. corticola* y *Di. mutila* en *Quercus* L. (Sánchez-Hernández et al. 2002; Sánchez et al. 2003; Alves et al. 2004; Linaldeddu et al. 2007). Otras especies de Botryosphaeriaceae tienen un carácter específico e infectan a especies vegetales concretas, tal es el caso de *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. y *Di. scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf. que afectan concretamente a *Pinus* y otras coníferas (Swart y Wingfield 1991; Burgess et al. 2004).

Debido a la importancia económica de las plantaciones forestales y de frutales, así como a la necesidad de proteger la flora autóctona, es importante identificar y caracterizar a los patógenos que puedan afectar a las especies que comparten el espacio con los cultivos de vid. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido el de evaluar la susceptibilidad de algunas especies vegetales, que comparten el hábitat con *Vitis vinifera*, frente a cuatro especies de Botryosphaeriaceae (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*). La susceptibilidad se evaluó en especies de interés agronómico como el almendro, el avellano, el melocotonero, el nogal y el olivo, y también en especies naturales típicas de las zonas de vid muestreadas, como la encina, el pino piñonero, la jara y el romero. El estudio permitió conocer la potencialidad como hospedadores secundarios de estas especies vegetales ante especies de Botryosphaeriaceae.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal y aislados fúngicos

En este ensayo se emplearon las siguientes especies de interés agrícola: almendro (*Prunus dulcis* L.), avellano (*Corylus avellana* L.), melocotonero (*Prunus persica* L.), nogal (*Juglans nigra* L.) y olivo (*Olea europaea* L. var. arbequina). La encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ilex*), el pino piñonero (*Pinus pinea* L.), la jara pringosa (*Cistus ladanifer*) y el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) fueron las especies seleccionadas entre la vegetación natural de las zonas donde se cultiva la vid. En la [Tabla 6.1](#) se indican las principales características del material vegetal empleado en el ensayo, entre ellas la procedencia de las plantas, el cuidado dispensado hasta su inoculación y las condiciones del material en el momento de la inoculación. Durante el desarrollo del experimento, todas las plantas se mantuvieron en un invernadero con sistema de refrigeración *cooling* y dotado de riego por goteo automatizado. En el invernadero, las plantas se agruparon por especie y se regaron adecuadamente para evitar la aparición de estrés hídrico.

Tabla 6.1 Material vegetal empleado en el estudio y mantenimiento del mismo desde su llegada a las instalaciones del IRTA hasta el inicio de las pruebas de patogenicidad.

	Fecha de recepción y tipo de material	Procedencia	Cultivo y manejo	Sustrato	Edad, longitud del tallo y fecha de inoculación
Almendro	Enero 2006 Plantas de 1 año	Noguera de Vivers S. L. (Lérida)	Transplantadas en macetas de 3 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	18 meses 73 cm Junio 2006
Avellano	Enero 2006 Plantas de 1 año	IRTA de Mas de Bover (Tarragona)	Plantadas en macetas de 3 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	18 meses 103 cm Junio 2006
Encina	Noviembre 2005 Bellotas	Cabrils (Barcelona)	Bellotas mantenidas 2 semanas a 4° C y plantadas en contenedores de 1 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	6 meses 53 cm Junio 2006
Jara	Octubre 2005 Semillas de Sierra Morena (Córdoba)	Semillas Silvestres S.L. (Córdoba)	Semillas introducidas en agua hervida hasta su enfriamiento, sembradas en semillero y transplantadas en macetas de 1 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	7 meses 39 cm Junio 2006
Melocotonero	Junio 2006 Plántulas de pocas semanas	Agromillora Catalana S.A (Barcelona)	Transplantadas en macetas de 3 l	3v arena roja: 2v arena blanca: 2v turba	1 año 60 cm Junio 2007
Nogal	Enero 2006 Plantas de 2 años	IRTA Mas de Bover (Tarragona)	Plantadas en macetas de 5 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	Inoculados los brotes del año 32 cm Junio 2006
Olivo	Octubre 2005 Plántulas de un año	Agromillora Catalana S.A (Barcelona)	Transplantadas en macetas de 3 l	2v arena blanca: 1v turba: 1v vermiculita	8 meses 67 cm Junio 2006
Pino	Enero 2005 Plantas de un año	Litoral catalán recolectadas año 1994-95	Mantenidas en bandejas de 50 celdas de 1 l de volumen	1v turba: 1v vermiculita	18 meses 50 cm Junio 2006
Romero	Enero 2006 Esquejes enraizados de un año	Vivers Riera Villagrassa (Barcelona)	Transplantadas en macetas de 3 l	2v turba: 1v perlita	18 meses 47 cm Junio 2006

Para la prueba de patogenicidad, se seleccionaron cuatro aislados de cuatro especies de *Botryosphaeriaceae* procedentes de nuestros muestreos de campo. Los aislados escogidos fueron *Botryosphaeria dothidea* (CBS 121484), *Diplodia seriata* (CBS 121485), *Neofusicoccum luteum* (CBS 121482) y *N. parvum* (CBS 121486). Para obtener más información sobre los aislados consultar la [Tabla Anexo 2](#). Los inóculos se prepararon a partir de fragmentos de micelio, incubados a 25° C en PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.), durante un máximo de 7 días antes de la inoculación.

6.2.2 Pruebas de patogenicidad

El estudio de la susceptibilidad de los distintos huéspedes se llevó a cabo mediante inoculaciones controladas siguiendo los postulados de Koch (Agrios 1969). Todas las especies vegetales se inocularon en Junio de 2006 excepto los melocotoneros, ya que su escaso desarrollo obligó a posponer su inoculación a Junio de 2007. Las especies se inocularon en el tallo principal salvo en el nogal, que se inocularon los tallos brotados del año. Las plantas se inocularon con un fragmento de micelio en una incisión practicada en el tallo, siguiendo la misma metodología de inoculación descrita en capítulos anteriores (ver capítulo 4). En el corte se dispuso como inóculo un fragmento de micelio de una colonia del hongo de unos 2,5 mm, y se selló con Parafilm ® (Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, EE.UU.). Se inocularon un total de 10 plantas de cada especie vegetal por aislado, y en los controles se dispuso como inóculo un fragmento de PDA estéril.

Durante el primer mes tras la inoculación, se realizó un seguimiento diario de las plantas inoculadas para detectar la posible muerte o seca del tallo inoculado. Cuando esto ocurrió, y para evitar la posterior colonización por hongos saprofitos, se procedió al análisis de todos los ejemplares de la especie inoculada con el hongo causante del colapso. La lectura de datos se realizó transcurridas dos semanas desde la muerte del último ejemplar. Por su parte, la lectura de datos de las especies vegetales que no sufrieron bajas se realizó a los 6 meses de la inoculación.

Para evaluar la susceptibilidad del hospedador, se anotaron detalles de la inoculación tanto a nivel externo como interno. Externamente, se observó la formación de chancros en el punto de inoculación y la aparición de fructificaciones en torno a la herida. A nivel interno, se midió la longitud total de las necrosis vasculares formadas desde el punto de inoculación. Para medir las lesiones internas, se eliminó la corteza y los tejidos subyacentes con ayuda de un bisturí y se anotó la longitud de la zona necrótica. Finalmente, se tomaron fragmentos de los tejidos afectados para reaislar el hongo inoculado y completar así los

postulados de Koch. La metodología empleada en los reislamientos fue la descrita en el capítulo 4.

6.2.3 Análisis de datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statistica versión 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Para establecer las relaciones de dependencia entre las variables discretas (formación de chancro y aparición de fructificaciones) y los factores (hospedador y especie fúngica) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En el caso de la variable continua (longitud de las necrosis) se realizó el análisis de la covarianza (ANCOVA) empleando como covariable la longitud del tallo de las especies vegetales para reducir el efecto que pudiera tener este parámetro sobre el desarrollo de las necrosis. Previamente, se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos y, en caso de necesidad, se aplicó la transformación logarítmica para cumplir con estos dos requisitos (Quinn y Keough 2002). Tras el ANCOVA, se aplicó el test de Dunnett que identifica los aislados con necrosis significativamente mayores que las del control. También se empleó el test de Tukey para detectar las diferencias significativas entre especies de Botryosphaeriaceae dentro de un hospedador concreto.

6.3 RESULTADOS

En la [Tabla 6.2](#) se exponen los resultados de la inoculación de las cuatro especies de Botryosphaeriaceae sobre los nueve hospedadores ensayados. Las plantas control de los distintos hospedadores mostraron heridas bien cicatrizadas y las necrosis vasculares medias no superaron el centímetro de longitud en ningún caso. En los controles tampoco se observó la formación de chancros ni la producción de cuerpos fructíferos en torno al punto de inoculación.

Algunas de las especies vegetales manifestaron una gran susceptibilidad a los aislados de *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*, ya que mostraron la seca del tallo inoculado en

Tabla 6.2 Resultados de las pruebas de patogenicidad de distintas especies de Botryosphaeriaceae sobre diferentes especies leñosas. Los valores expresan el promedio sobre diez ejemplares inoculados en cada caso.

Especie	Código CBS	Almendro^a						Avellano						Encina^a					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.
Control		0	0	0	0,47	b	0	0	0	0	0,05	C	0	0	0	0	0,00	c	0
<i>B. dothidea</i>	121484	0	9	0	12,74	a	100	0	1	2	1,08	B	100	0	10	0	1,08	b	100
<i>Di. seriata</i>	121485	0	10	0	15,18	a	80	0	0	5	0,80	B	100	0	9	9	0,50	bc	100
<i>N. luteum</i>	121482	1	8	2	9,59	a	90	0	10	8	6,21	A	90	8	3	5	2,65	a	100
<i>N. parvum</i>	121486	3	6	6	12,38	a	100	0	9	8	5,69	A	100	6	4	0	3,98	a	100
Especie	Código CBS	Jara^a						Melocotonero^a						Nogal^a					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.
Control		0	0	0	0,10	d	0	0	0	0	0,95	D	0	0	0	0	0,00	d	0
<i>B. dothidea</i>	121484	2	6	2	2,84	c	100	1	8	1	9,93	A	90	0	6	0	1,82	c	100
<i>Di. seriata</i>	121485	0	8	0	1,80	bc	100	0	8	0	5,52	B	100	0	4	1	1,77	bc	80
<i>N. luteum</i>	121482	8	2	2	6,47	ab	100	4	0	2	13,78	A	100	1	9	3	3,55	ab	70
<i>N. parvum</i>	121486	9	2	1	7,28	a	100	2	2	1	13,16	A	100	5	3	8	6,33	a	100
Especie	Código CBS	Olivo						Pino						Romero					
		Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.	Muertas	Chancro	Fruct.	Necr.	Sig.	% Reaisl.
Control		0	0	0	0,07	c	0	0	0	0	0,04	D	0	0	0	0	0,03	c	0
<i>B. dothidea</i>	121484	0	0	0	0,13	bc	100	0	4	0	0,39	Bc	90	0	0	0	1,05	ab	90
<i>Di. seriata</i>	121485	0	0	1	0,23	bc	100	0	0	0	0,13	Cd	70	0	0	0	0,31	c	10
<i>N. luteum</i>	121482	0	3	0	0,34	b	100	0	5	0	0,54	Ab	90	0	0	0	1,08	b	50
<i>N. parvum</i>	121486	0	9	1	1,53	a	100	0	6	0	0,80	A	100	0	3	1	2,20	a	90

^a Para estos hospedadores, los resultados de los hongos que causaron mortalidad se recuperaron al mes de la inoculación.

Muertas: Número de plantas que presentaron el tallo inoculado muerto o seco.

Chancro: Número de plantas en las que se formó chancro en el punto de inoculación.

Fructificaciones (Fruct.): Número de plantas en las que aparecieron fructificaciones en torno al punto de inoculación.

Longitud de la necrosis (Necr.): Longitud de la necrosis vascular desde el punto de inoculación (en cm). En negrita, necrosis mayores que el control respectivo según el test de Dunnett.

Significación (Sig.): Rangos de significación comparando los diferentes hongos inoculados para un hospedador concreto según el test de Tukey.

Porcentaje de reaslamiento (% Reaisl.): Porcentaje de reaslamiento de la especie inoculada a partir de la madera infectada.

las primeras semanas tras la inoculación (Figura 6.1). El colapso del tallo inoculado se produjo por encima del punto de inoculación y, en todos los casos, las plantas rebrotaron por debajo de la zona afectada. El aislado de *N. parvum* provocó la muerte del tallo de 25 plantas (3 almendros, 6 encinas, 9 jaras, 2 melocotoneros y 5 nogales). Por su parte, el aislado de *N. luteum* secó el tallo de 22 plantas (1 almendro, 8 encinas, 8 jaras, 4 melocotoneros y 1 nogal) (Tabla 6.2). Las especies más sensibles fueron la jara y la encina, con más del 50% de los ejemplares afectados. Otro aislado que también causó mortalidad en los tallos inoculados fue *Botryosphaeria dothidea*, que afectó a dos ejemplares de jara y uno de melocotonero. El resto de hospedadores (avellano, olivo, pino y romero) no sufrieron el colapso del tallo inoculado para ninguno de los hongos ensayados.

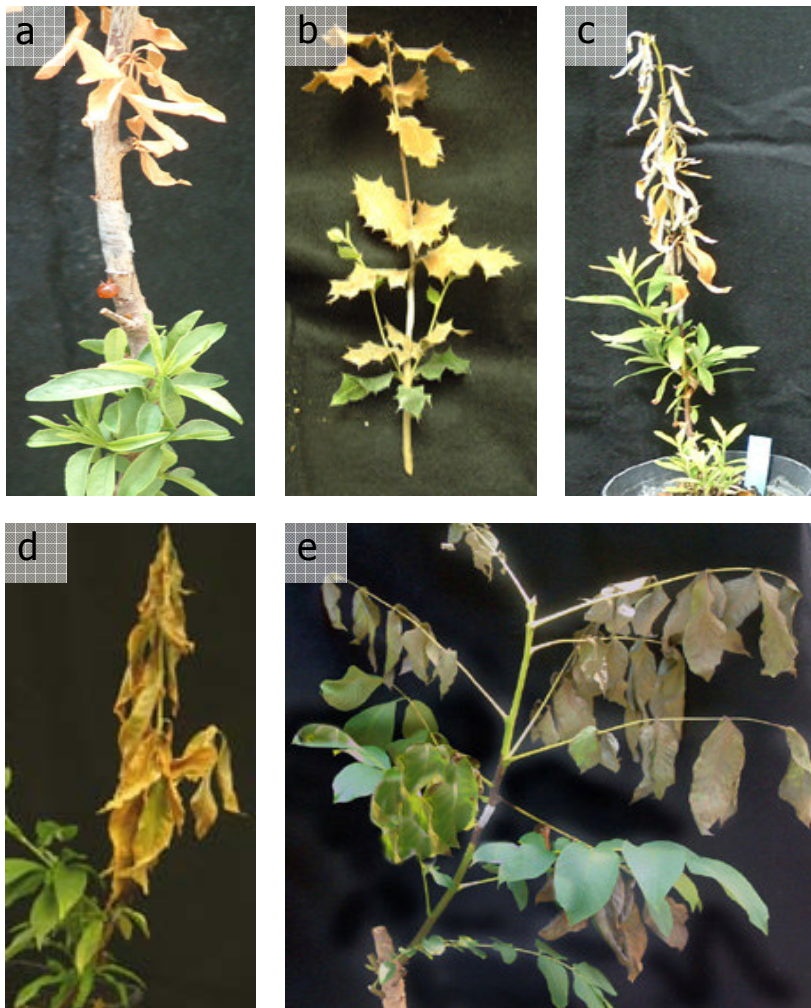


Figura 6.1 Seca de plantas inoculadas con *Neofusicoccum luteum* CBS 121482 en almendro (a), encina (b) y jara (c) y seca causada por *N. parvum* CBS 121486 en melocotonero (d) y nogal (e).

A pesar de que la lectura de las plantas afectadas de colapso se produjo tan sólo un mes después de la inoculación, todas ellas mostraron necrosis vasculares muy evidentes. En todas las plantas inoculadas con *N. luteum* y *N. parvum*, de las que se pudo tomar medida de la necrosis, se apreciaron importantes daños vasculares, con necrosis aparentes. De estas plantas se reaisló el hongo inoculado en un porcentaje que osciló entre el 50 y el 100% de los casos (Tabla 6.2).

La formación de chancros y la producción de cuerpos fructíferos de los hongos inoculados mostraron diferencias significativas dependiendo del hospedador y del hongo ($p < 0,01$). A nivel global, no existió una única especie patógena responsable de una mayor formación de chancros y fructificaciones, ya que ambas variables dependieron mucho del hospedador empleado. En el conjunto de las cuatro especies de Botryosphaeriaceae inoculadas, el 85% de los almendros y el 70% de las encinas presentaron chancros (Tabla 6.2; Figura 6.2). El hospedador que menor proporción de chancros mostró fue el romero, que no alcanzó el 10% de media, mientras que el resto de especies vegetales oscilaron entre el 30 y el 55%.

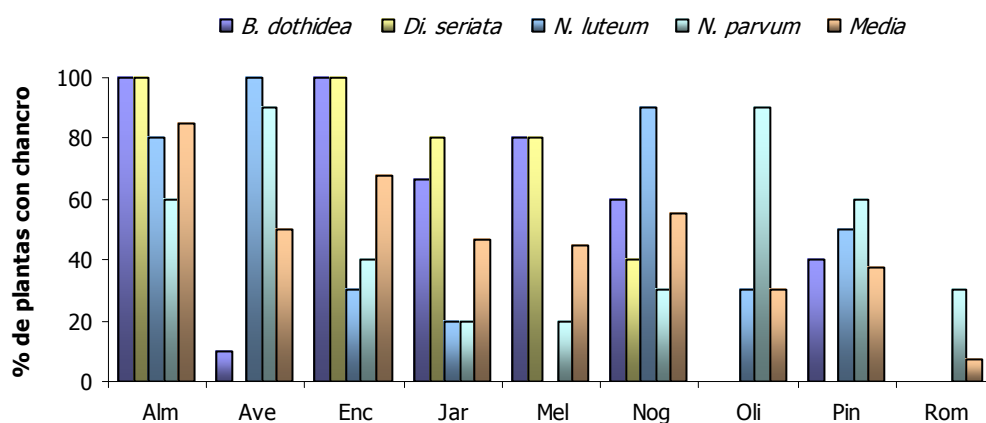


Figura 6.2 Porcentaje de chancros producidos por las cuatro especies de Botryosphaeriaceae inoculadas y media de todas ellas en nueve hospedadores: almendro (Alm), avellano (Ave), encina (Enc), jara (Jar), melocotonero (Mel), nogal (Nog), olivo (Oli), pino (Pin) y romero (Rom).

En cuanto a la formación de fructificaciones en torno a la herida, las especies vegetales que mayores porcentajes medios presentaron fueron el avellano (60%) y la encina (40%) (Tabla 6.2; Figura 6.3). Tres hospedadores, olivo, pino y romero, mostraron fructificaciones en menos del 10% de sus ejemplares, y el resto de especies vegetales variaron entre el 10 y el 30%.

La morfología de las necrosis vasculares fue variable en los distintos hospedadores inoculados (Figura 6.4). En las inoculaciones de *N. parvum* en nogal, se apreciaron necrosis muy largas y de un color marrón intenso que rodearon en diámetro el tallo inoculado y que, en ocasiones, necrosaron todos los tejidos, provocando su colapso. En avellano, las necrosis también tuvieron una longitud importante aunque fueron de un color menos intenso y los tejidos no se vieron afectados en la totalidad del diámetro. Por su parte, los olivos mostraron necrosis reducidas y de una tonalidad mucho más tenue.

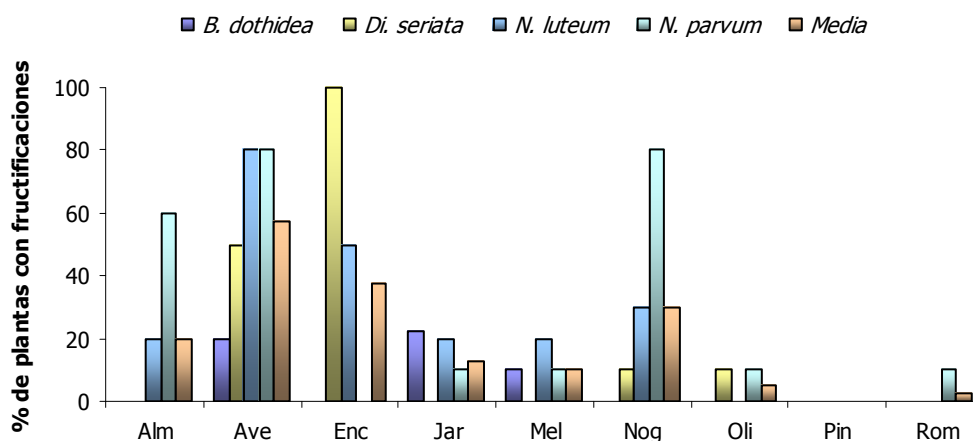


Figura 6.3 Porcentaje de fructificaciones producidas por las cuatro especies de Botryosphaeriaceae inoculadas y media de todas ellas en nueve hospedadores: almendro (Alm), avellano (Ave), encina (Enc), jara (Jar), melocotonero (Mel), nogal (Nog), olivo (Oli), pino (Pin) y romero (Rom).

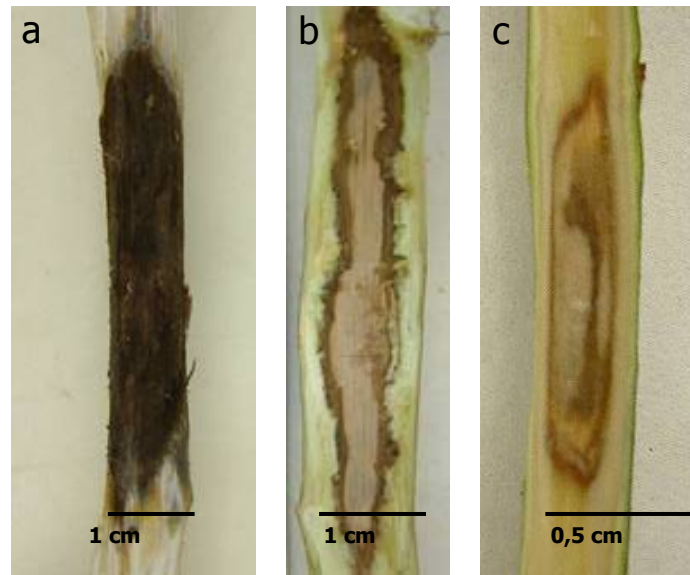


Figura 6.4 Necrosis resultantes de las inoculaciones de *Neofusicoccum parvum* CBS 121486 en nogal (a), avellano (b) y olivo (c).

Las dimensiones de las necrosis mostraron diferencias estadísticas significativas según la especie vegetal ($p < 0,01$) y la especie de Botryosphaeriaceae inoculada ($p < 0,01$) (Tabla 6.3; Figuras 6.5a y 6.5b). Además, resultó significativa la interacción entre el patógeno y el hospedador ($p < 0,01$) (Tabla 6.3; Figura 6.6). Sin embargo, la longitud del tallo inoculado, covariable en el análisis de la covarianza, no afectó a la longitud de las necrosis ($p = 0,37$) (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Resultado del ANCOVA para el análisis de la longitud de la necrosis en los distintos hospedadores inoculados con cuatro especies de Botryosphaeriaceae. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
Longitud del tallo	1	0,82	0,37
Especie de Botryosphaeriaceae	4	267,70	< 0,01
Hospedador	8	65,21	< 0,01
Especie * Hospedador	32	5,49	< 0,01

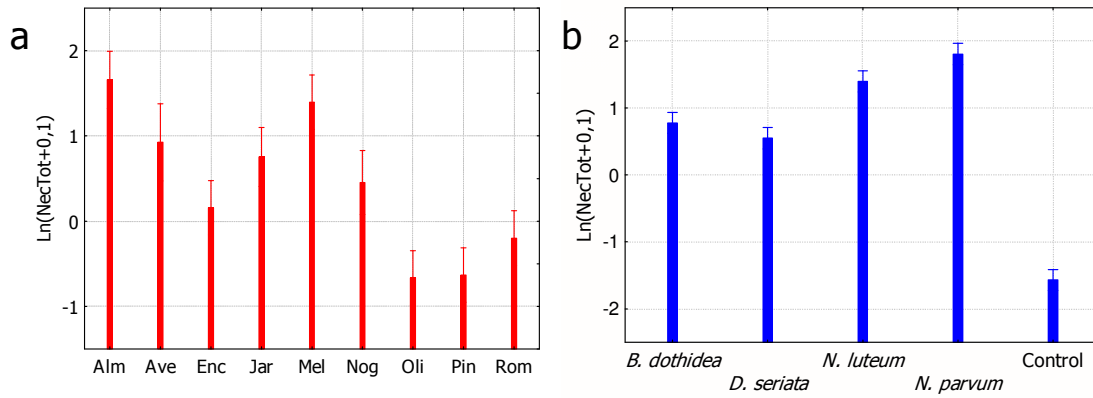


Figura 6.5 Longitud media de las necrosis vasculares (variable transformada mediante logaritmo) generadas por las especies de Botryosphaeriaceae en los nueve hospedadores: almendro (Alm), avellano (Ave), encina (Enc), jara (Jar), melocotonero (Mel), nogal (Nog), olivo (Oli), pino (Pin) y romero (Rom) **(a)**. Longitud media de las necrosis generadas por las cuatro especies de Botryosphaeriaceae en los hospedadores **(b)**. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

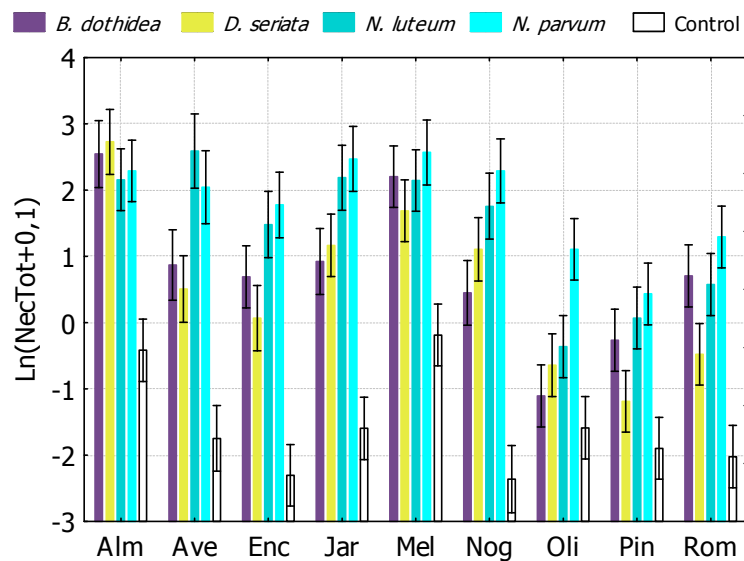


Figura 6.6 Longitud de las necrosis (variable transformada mediante logaritmo) detallada para cada una de las cuatro especies de Botryosphaeriaceae en los nueve hospedadores: almendro (Alm), avellano (Ave), encina (Enc), jara (Jar), melocotonero (Mel), nogal (Nog), olivo (Oli), pino (Pin) y romero (Rom). Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

En conjunto, las cuatro especies de Botryosphaeriaceae causaron necrosis significativamente superiores al control. Con respecto al control, todos los hospedadores mostraron necrosis significativamente diferentes en las cuatro especies fúngicas ensayadas,

excepto *Di. seriata*, en pino y romero, y, *B. dothidea*, en olivo. El patógeno que formó las mayores necrosis fue *N. parvum*, seguido de *N. luteum* y, por último, *B. dothidea* y *Di. seriata*. Las especies vegetales más sensibles fueron el almendro y el melocotonero, con necrosis medias respectivas de 12,5 y 10,6 cm, respectivamente. En un segundo nivel se encuentran la jara, el avellano y el nogal, que mostraron necrosis en torno a los 4 cm. Las lesiones medidas en encina y romero fueron, respectivamente, de 2 y 1,1 cm y, por último, las necrosis resultantes en pino y olivo no alcanzaron el centímetro de longitud (Tabla 6.2; Figura 6.5a).

El melocotonero mostró las necrosis más desarrolladas para los patógenos *N. luteum* y *N. parvum*. Esta situación volvió a producirse en avellano, encina, jara y nogal, con necrosis mayores para estos dos hongos (Figura 6.6). En olivo, pino y romero, las necrosis causadas por *N. luteum* y *N. parvum* se redujeron de forma importante y fueron muy parecidas a las causadas por los otros dos hongos. Sin embargo, en almendro, una de las especies más sensibles, se invirtió el comportamiento y las necrosis más largas las produjeron *Di. seriata* seguida de *B. dothidea* y *N. parvum* y, por último, *N. luteum* (Figura 6.6).

6.4 DISCUSIÓN

De acuerdo con los daños vasculares observados en el ensayo, todas las especies vegetales ensayadas mostraron susceptibilidad a los patógenos inoculados y podrían actuar potencialmente como huéspedes alternativos de Botryosphaeriaceae. Las especies que mayores necrosis mostraron fueron el almendro y el melocotonero, dos rosáceas de las que, previamente, ya se conocía su susceptibilidad a Botryosphaeriaceae. *Botryosphaeria dothidea* se citó, por primera vez en California, en almendro (English et al. 1966). En Georgia (EE.UU.), la formación de gomosis en melocotoneros se relaciona con *B. dothidea*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*, y se ha demostrado que las dos primeras especies causan la muerte de yemas en este árbol (Britton y Hendrix 1982; Britton y Hendrix 1989).

Las necrosis vasculares y la mortalidad de ejemplares confirman la especial susceptibilidad de almendros, encinas, jaras, melocotoneros y nogales. Los patógenos que

causaron una mayor mortalidad fueron *Neofusicoccum parvum* y *N. luteum*. Estas especies ya habían causado la muerte del sarmiento inoculado en ensayos de vid realizados por nuestro equipo (ver capítulos 4 y 5). *Neofusicoccum parvum*, una de las especies que provocó las lesiones vasculares de mayores dimensiones, se asoció a chancros en la corteza de ramas y ramillas en alcornoques italianos (Linaldeddu et al. 2007). Aunque de menor importancia, *B. dothidea* también causó bajas en jara y melocotonero. En el sudoeste español, *B. dothidea*, se aisló, de forma consistente, de *Quercus* mediterráneos (*Q. ilex* y *Q. suber*) afectados de decaimiento (Sánchez et al. 2003). *Botryosphaeria dothidea* también se ha reconocido como un patógeno primario de *Cistus ladanifer* en Andalucía (Sánchez-Hernández et al. 2002). En nogal, se han citado al menos dos especies de Botryosphaeriaceae, *B. dothidea* y *Neofusicoccum ribis*, esta última asociada a la muerte de ramas (Rumbos 1987). Hoy en día se sabe que muchas especies de Botryosphaeriaceae no tienen un hospedador específico; concretamente, las especies *B. dothidea*, *Di. seriata* y *N. parvum* se han descrito como especies de “hospedador neutro” o plurívoras (Slippers y Wingfield 2007). Nuestros resultados permiten apuntar que *N. luteum* también se trataría de una especie plurívora.

En nuestro ensayo, las especies de olivo, pino y romero mostraron una susceptibilidad menor a las cuatro especies de Botryosphaeriaceae. En olivo, *N. ribis* se ha vinculado con el decaimiento de ramas en Andalucía (Romero et al. 2005) y *B. dothidea* con la pudrición de frutos en Grecia (Phillips et al. 2005). En *Pinus* se ha identificado al patógeno *Diplodia pinea*, que muestra una relación bien especializada con este género y otras especies de coníferas (Swart y Wingfield 1991; Burgess et al. 2004). Según pudieron observar Swart y Wingfield (1991), los niveles de infección varían enormemente según la especie de *Pinus* afectada. En cuanto a las otras especies de Botryosphaeriaceae, no se han encontrado referencias que destaquen su efecto sobre *Pinus pinea* y *Rosmarinus officinalis*, por lo que este ensayo de patogenicidad es el primero que relaciona ambos grupos de especies.

En un estudio de patogenicidad similar desarrollado en Sudáfrica, se concluyó que las ocho especies de Botryosphaeriaceae ensayadas suponían una amenaza tanto para algunas

especies autóctonas de mirtáceas como para los eucaliptos introducidos (Pavlic et al. 2007). Si bien todas estas especies vegetales pertenecen a la misma familia, es una prueba de la coexistencia de especies de Botryosphaeriaceae en ambos grupos y de la potencial amenaza que suponen para ellos. En otro estudio centrado en la taxonomía de Botryosphaeriaceae en frutales, se identificó, por primera vez, a *Neofusicoccum australe* en manzano, peral, ciruelo y almendro en Sudáfrica (Slippers et al. 2007). Según los autores, este hallazgo no fue del todo inesperado ya que recientemente se había identificado esta especie en vides sudafricanas y ambas plantaciones suelen estar próximas (Van Niekerk et al. 2004). *Neofusicoccum australe* también había sido identificado en hospedadores nativos australianos, como *Acacia* sp. Mill. (Slippers et al. 2004). Por tanto, *N. australe* se ha reconocido en tres tipos de hospedadores: vid, plantaciones vecinas y vegetación autóctona. Existen varios casos en los que se han identificado otros patógenos de *Vitis vinifera* sobre diversas especies vegetales que se encuentran en las proximidades de las plantaciones de vid. Por ejemplo, en California se ha encontrado la forma sexual de *Phaeoacremonium viticola* J. Dupont sobre fresnos (*Fraxinus latifolia* Benth.) afectados de decaimiento y localizados en zonas vecinas a los viñedos (Eskalen et al. 2005). En California también se han aislado por primera vez en manzano *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf., *Togninia fraxinopennsylvanica* (T.E. Hinds) Hausner, Eyjólfsson & J. Reid (anamorfo *Phaeoacremonium mortoniae* Crous & W. Gams) (Gallegos et al. 2007). Estos hallazgos sugieren que estos hospedadores alternativos podrían ser una importante fuente de inóculo para algunos patógenos de la vid y, por tanto, podría tener implicaciones en la epidemiología y control de estas enfermedades.

Algunos autores opinan que el papel que desarrollan las Botryosphaeriaceae en una determinada área viene determinado por factores del medio abiótico, por la presión del inóculo formado en los distintos hospedadores, la competición entre las comunidades endófitas y las características fisiológicas y físicas del hospedador (Saikkonen 2007; Slippers y Wingfield 2007). Considerando la patogenicidad de estos hongos sobre las especies vegetales estudiadas, es necesario llevar a cabo investigaciones que aclaren si los taxones más sensibles son capaces de infectarse naturalmente en campo. De este modo, se confirmará la importancia de las

especies vegetales estudiadas como hospedadores alternativos y fuentes de inóculo de especies de Botryosphaeriaceae que, más tarde, podrían infectar a la vid.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1969). Plant Pathology. APS Press, New York (EE.UU.). 629 pp.
- Alves, A., Correia, A., Luque, J. y Phillips, A. (2004). *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96, 598-613.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R. y Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 19, 535-544.
- Britton, K. O. y Hendrix, F. F. (1982). Three species of *Botryosphaeria* cause peach tree gummosis in Georgia. *Plant Disease* 66, 1120-1121.
- Britton, K. O. y Hendrix, F. F. (1989). Infection of peach buds by *Botryosphaeria obtusa*. *Plant Disease* 73, 65-68.
- Britton, K. O., Hendrix, F. F., Pusey, P. L., Okie, W. R., Reilly, C. C. y Daniell, J. W. (1990). Evaluating the reaction of peach cultivars to infection by three *Botryosphaeria* species. *HortScience* 25, 468-470.
- Brown-Rytlewski, D. E. y McManus, P. S. (2000). Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease* 84, 1031-1037.
- Burgess, T. y Wingfield, M. J. (2002). Impact of fungal pathogens in natural forests ecosystems: a focus on Eucalyptus. In: *Microorganism in Plant Conservation and Biodiversity*. Sivasithamparam, K., Dixon, K. W., Barrett, R. L. (Eds.). Springer, Dordrecht, (Holanda). 392 pp.
- Burgess, T., Wingfield, M. J. y Wingfield, B. D. (2004). Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers. *Australasian Plant Pathology* 33, 513-519.
- English, H., Davis, J. R. y Devay, J. E. (1966). Dothiorella canker, a new disease of almond trees in California. *Phytopathology* 56, 146.
- Eskalen, A., Rooney-Latham, S. y Gubler, W. D. (2005). First report of perithecia of *Phaeoacremonium viticola* on grapevine (*Vitis vinifera*) and ash tree (*Fraxinus latifolia*) in California. *Plant Disease* 89, 686.
- Gallegos, L., Rooney-Latham, S. y Gubler, W. D. (2007). Apple as a possible alternative host for grapevine pathogens in California. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 117.
- Linaldeddu, B. T., Franceschini, A., Luque, J. y Phillips, A. J. L. (2007). First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* 91, 324.
- Parker, K. C. y Sutton, T. B. (1993). Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. *Plant Disease* 77, 385-389.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A. y Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology* 56, 624-636.
- Phillips, A. J. L., Rumbos, I. C., Alves, A. y Correia, A. (2005). Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia* 159, 433-439.
- Pusey, P. I. (1993). Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease* 77, 170-174.
- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge (Gran Bretaña). 537 pp.
- Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews* 21, 67-74.
- Romero, M. A., Sánchez, M. E. y Trapero, A. (2005). First Report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. *Plant Disease* 89, 208.
- Rumbos, I. C. (1987). Twig and branch dieback of walnut trees induced by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Pathology* 36, 602-605.

- Sánchez, M. E., Venegas, J., Romero, M. A., Phillips, A. J. L. y Trapero, A. (2003). *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87, 1515-1521.
- Sánchez-Hernández, M. E., Gutiérrez-García, J. y Trapero-Casas, A. (2002). *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathology* 51, 365-373.
- Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Carnegie, A. J. and Wingfield, M. J. (2004). Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology* 50, 343-358.
- Slippers, B., Smith, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56, 128-139.
- Slippers, B. y Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Review* 21, 90-106.
- Smith, H., Crous, P. W., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A. y Wingfield, B. D. (2001). *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 93, 277-285.
- Swart, W. J. y Wingfield, M. J. (1991). Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75, 761-766.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald J. Z., Fourie, P. H. y Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.
- Von Arx, J. A. y Müller, E. (1954). Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11, 1-434.
- Wingfield, M. J. (2003). Increasing threat of diseases to exotic plantation forests in the Southern Hemisphere: lessons from *Cryphonectria* canker. *Australasian Plant Pathology* 32, 133-139.
- Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T. y Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 238-244.

EFFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO Y LA INOCULACIÓN CON *Neofusicoccum parvum* EN *Vitis vinifera*

7.1	INTRODUCCIÓN	170
7.2	MATERIAL Y MÉTODOS	171
	7.2.1 Material vegetal	171
	7.2.2 Diseño experimental.....	172
	7.2.3 Sistema de riego e inoculación con <i>Neofusicoccum parvum</i>	172
	7.2.4 Variables estudiadas.....	173
	7.2.5 Análisis de datos	177
7.3	RESULTADOS	178
	7.3.1 Crecimiento vegetal.....	178
	7.3.2 Relaciones hídricas.....	182
	7.3.3 Desarrollo del patógeno <i>Neofusicoccum parvum</i>	184
7.4	DISCUSIÓN	184
7.5	BIBLIOGRAFÍA	187

RESUMEN

Se ha documentado que, en ocasiones, el estrés hídrico favorece el desarrollo de algunos hongos patógenos en el hospedador. Sin embargo, se tiene un conocimiento escaso de los patógenos de madera de la vid y su interacción con el estrés hídrico a lo largo del ciclo de la enfermedad. Para estudiar esta interacción, se planteó un ensayo de invernadero con cuatro grupos de vides que combinaban la infección fúngica de *Neofusicoccum parvum* con la falta de riego. De esta forma, se pudo analizar el efecto, aislado y combinado, de ambos factores sobre algunas variables de la planta. Se estudiaron variables fisiológicas, como la conductancia estomática y el potencial hídrico, y del crecimiento, como el incremento del diámetro y las contracciones diarias del sarmiento. Los resultados obtenidos mostraron que la longitud de las necrosis causadas por *N. parvum* no aumentaron significativamente con el déficit hídrico, demostrando que no es un patógeno de debilidad. Por su parte, la infección fúngica y la falta de agua afectaron, de forma independiente, la fisiología y el crecimiento de la vid, y tan sólo se observó una sinergia entre factores para las contracciones diarias del sarmiento.

7.1 INTRODUCCIÓN

En periodos de déficit hídrico, el cierre de los estomas provoca una disminución de la actividad fotosintética que reduce la producción de metabolitos necesarios para el crecimiento y la defensa de la planta (Agrios 1969; Salisbury y Ross 1992). El efecto y la intensidad del estrés hídrico pueden ser medidos a través de variables de la planta como la conductancia estomática y la transpiración, directamente relacionadas con la fotosíntesis, y el potencial hídrico. La conductancia estomática y la transpiración indican la cantidad de agua perdida por superficie foliar y unidad de tiempo (Percy et al. 1989) mientras que el potencial hídrico foliar (Ψ_f) expresa la tensión con la que el agua se encuentra retenida en la hoja (Koide et al. 1989). El Ψ_f desciende de forma natural debido a la transpiración aunque este gradiente de presión de la raíz a las hojas se ve aumentado en condiciones de estrés hídrico (Tyree y Ewers 1991; Escalona et al. 1999). El consumo de agua en la planta está directamente relacionado con la formación de tejidos, por tanto, el estudio del crecimiento de la planta también nos informa sobre la intensidad y el efecto de la falta de agua. Mediante la tecnología de los sensores LDVT (*linear variable displacement transducer*), que miden el desplazamiento que sufre un tejido vegetal vivo, se integra la información tanto del estado hídrico de la planta como del crecimiento de la misma. (Huguet et al. 1992; Intrigolo y Castel 2007).

En ocasiones, el estrés hídrico severo y prolongado puede causar por sí mismo la muerte de la planta. Sin embargo, es más común que, por ejemplo en árboles, la mortalidad por estrés se deba normalmente al ataque de organismos patógenos oportunistas que consiguen invadir y colonizar los tejidos vegetales (Wargo 1996). Algunos patógenos pueden provocar alteraciones similares a las causadas por el estrés hídrico, ya que durante la infección se reduce el flujo de agua de las raíces a las hojas (Ayres 1991; Shain 1995). Frecuentemente, los síntomas asociados a las enfermedades se pueden agravar cuando las plantas están sometidas a estrés hídrico como ocurre, por ejemplo, en la infección del melocotonero por

Botryosphaeria dothidea (Pusey 1989).

En muchas zonas donde se cultiva la vid, la producción suele estar limitada, en mayor o menor medida, por la escasez de agua; incluso en países con temperaturas moderadas, las vides pueden sufrir periodos de sequía (Braun y Schmid 1999). La presencia de especies de Botryosphaeriaceae en numerosas regiones vitícolas en las que pueda haber periodos de sequía, de mayor o menor duración, hace muy probable que ambos factores se combinen en campo. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue conocer el efecto del estrés hídrico sobre la fisiología y el crecimiento de la vid, y también sobre el desarrollo del patógeno *Neofusicoccum parvum* en el huésped. Para ello, se estudió el efecto del estrés hídrico sobre dos variables fisiológicas (conductancia estomática y potencial hídrico en hoja) y dos variables relacionadas con el crecimiento de la planta (incremento en el diámetro del sarmiento y sus contracciones diarias), así como sobre la longitud de las necrosis causadas por el patógeno. El segundo objetivo fue comprobar cómo afecta la interacción estrés hídrico/patógeno a la vid, para lo que se analizó el efecto combinado de los dos factores sobre los distintos parámetros estudiados.

7.2 MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1 Material vegetal

En este ensayo se emplearon vides de la variedad Tempranillo injertadas sobre el patrón Richter 110 (R110) proporcionadas por los viveros de Bodegas Miguel Torres. A principios de abril de 2007, se transplantaron a macetas de 3 litros con un sustrato de arena roja, arena de sílice blanca y turba (Floragard Floratorf, Oldenburg, Alemania), en proporción 3:2:2 (v:v:v). En cada maceta, se colocó un tutor de caña de 1,5 m de altura para dirigir el crecimiento del sarmiento en vertical. Las plantas se mantuvieron en un invernadero dotado de un sistema de refrigeración *cooling* y se fertilizaron semanalmente con 10 ml de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Aaron 1950).

7.2.2 Diseño experimental

El experimento lo compusieron un total de 188 vides, que se dividieron en cuatro grupos de 47 plantas cada uno. Los grupos se diseñaron para testar el efecto, tanto aislado como combinado, del estrés hídrico y del patógeno inoculado en la planta. Por tanto, las plantas se dividieron en: 1) vides afectadas por estrés hídrico, 2) vides inoculadas con el patógeno, 3) vides sometidas a estrés hídrico e inoculadas con el patógeno y 4) vides control (no sometidas a estrés hídrico, ni inoculadas con el patógeno). Se seleccionó un diseño experimental de parcelas divididas (*split-plot*) en el que el factor riego se aplicó a la parcela y el factor hongo a la subparcela (Figura 7.1). A lo largo de una bancada del invernadero, las vides se organizaron en subparcelas de cuatro a seis plantas que se distribuyeron en bloques alternos para crear un patrón que homogeneizase la variabilidad ambiental. En la bancada, se colocó un *datalogger* dotado de sensores LDVT, que se fijaron al sarmiento de 8 plantas de cada grupo, y que registró las variaciones en el diámetro de los sarmientos. A ambos lados de la bancada y en los extremos del *datalogger*, se colocaron vides, no incluidas en el experimento, para intentar reducir el efecto "borde".

7.2.3 Sistema de riego e inoculación con *Neofusicoccum parvum*

Las vides no sometidas a estrés hídrico (94 plantas) se mantuvieron con riego automático por goteo, tres veces al día (9, 13 y 17 horas) y tres días por semana (lunes, miércoles y viernes). El volumen regado fue ajustándose en función de las condiciones climáticas, siendo la media del experimento de unos 300 ml/planta en cada día de riego.

Las vides sometidas a estrés (94 plantas) se mantuvieron bajo ciclos de sequía y posterior rehidratación con un volumen de agua calculado del modo que se explica a continuación. Se aislaron cinco vides del experimento y se regaron hasta que el sustrato estuvo saturado de agua. Una vez drenado el exceso de agua, se pesaron en una balanza y se anotó el peso de cada una de ellas a capacidad de saturación del sustrato. Diariamente, se midió el peso

de estas plantas y se registró la diferencia con el peso a capacidad de saturación. Se observó que, cuando las plantas habían reducido su peso en torno a un kilogramo, el sustrato había perdido prácticamente toda su humedad. Por tanto, se tomó este dato para fijar el final del periodo de estrés y regar las vides estresadas con un volumen de agua equivalente. El tiempo que tardaron las plantas estresadas en perder ese volumen varió entre cuatro y seis días, en función de las condiciones ambientales. Las 94 plantas estresadas iniciaron la fase de estrés el 31 de Mayo de 2007 y acabaron el 1 de Octubre del mismo año, habiendo pasado por 20 ciclos de estrés. En la [Figura 7.2](#) se muestra el volumen de agua añadido a las vides sometidas y no sometidas a estrés hídrico y las oscilaciones de temperatura a lo largo del experimento.

El 15 de Junio, habiendo transcurrido dos ciclos de estrés hídrico, se procedió a la inoculación de 94 vides, 47 de ellas estresadas, con el aislado CBS 121486 de *Neofusicoccum parvum*. Se seleccionó este aislado debido a la alta virulencia mostrada en ensayos previos (ver capítulo 4). Las plantas se inocularon con un fragmento de micelio en una incisión practicada en el portainjerto, siguiendo la misma metodología descrita en capítulos anteriores. En el corte se dispuso como inóculo un fragmento de micelio de una colonia del hongo de unos 2,5 mm, y se selló con Parafilm ® (Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, EE.UU.). Las 94 vides restantes, 47 de ellas también estresadas, se inocularon con fragmentos de PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.), estéril, de idéntico tamaño, utilizando la misma técnica de inoculación.

7.2.4 Variables estudiadas

Para el estudio del efecto de la sequía y del patógeno *N. parvum* sobre la vid, se analizaron dos variables relativas al crecimiento de la planta: el incremento en diámetro del sarmiento y la contracción máxima diaria de sus tejidos. También se tomaron datos de dos parámetros fisiológicos: la conductancia estomática y el potencial hídrico en hoja. Al final del experimento se midió la longitud de las necrosis generadas por *N. parvum* en las plantas inoculadas, con el fin de analizar el efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo del patógeno.

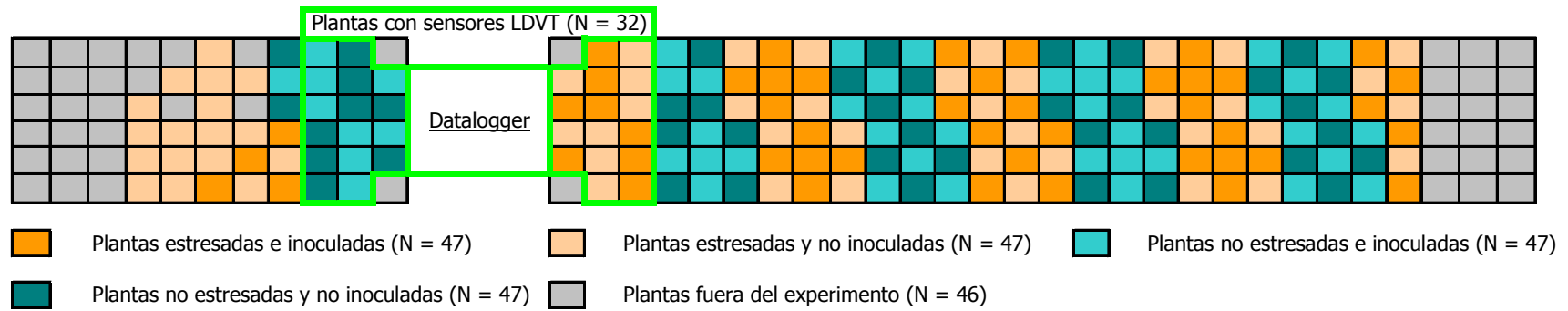


Figura 7.1 Esquema de la distribución de los diferentes grupos experimentales sobre la bancada del invernadero. Hacia la parte central se muestra la ubicación del *datalogger* y las plantas con los sensores LDVT conectados a él.

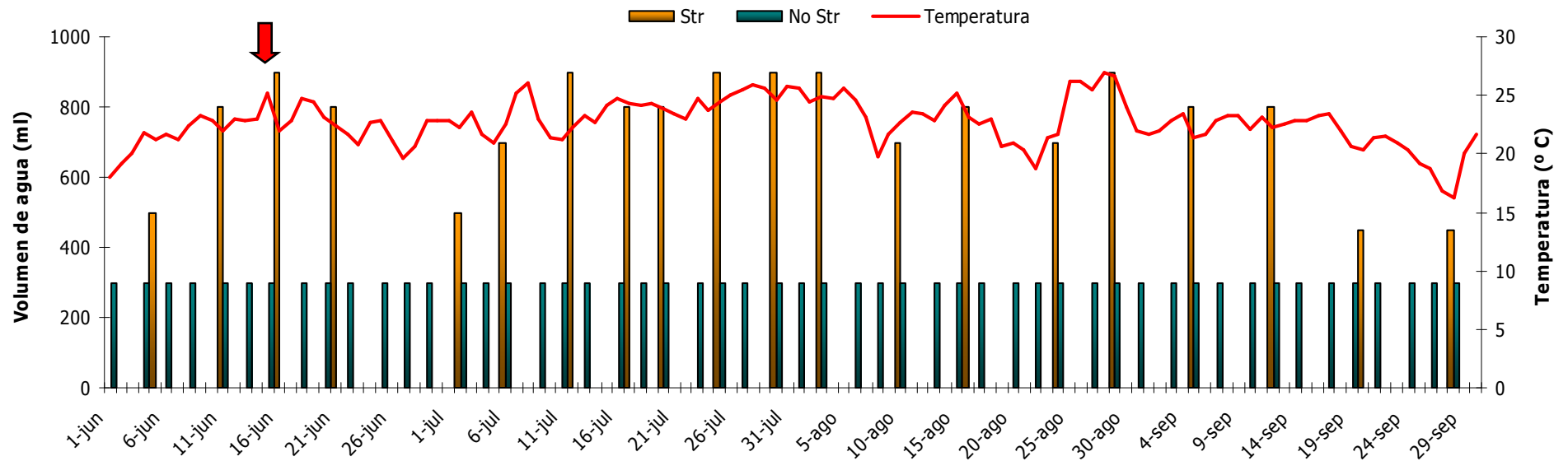


Figura 7.2 Volumen de agua añadido a las plantas no sometidas a estrés hídrico (No Str, barra azul) y a las estresadas hídricamente (Str, barra naranja) junto con las oscilaciones de temperatura a lo largo del experimento. La flecha indica la fecha de inoculación de las plantas.

El incremento del diámetro del sarmiento y las contracciones máximas sufridas por éste se midieron con sensores LDVT (modelo DF $\pm 2,5$ mm, precisión ± 10 μ m, de Solartron Metrology, Bogno Regis, Gran Bretaña). El sensor está compuesto de un núcleo cilíndrico, que contiene tres bobinas eléctricas y una aguja metálica, de ferro-níquel, que se mueve libremente por un canal-guía a lo largo del cilindro y que registra el movimiento del objeto estudiado. El sensor se sujetó al sarmiento, unos 15 cm por encima del punto de inoculación, con un soporte especial de invar y aluminio (Figura 7.3). La aguja se fijó al sarmiento mediante cola para injertos Kollant Arbokol (Kollant S. p. A., Padova, Italia). El número de sensores empleados en el experimento fue de 32, distribuidos en 8 plantas para cada tratamiento experimental. Los registros captados por los sensores se acumularon en un *datalogger* (modelo CR10 con multiplexador AM416, de Campbell Scientific Ltd, Logan, Utah, EE.UU.) cada 30 segundos, guardando las medias cada 30 minutos. El sistema se mantuvo con la energía suministrada por una batería de coche convencional de 12 V y los datos registrados se descargaron en un ordenador portátil cada dos semanas.

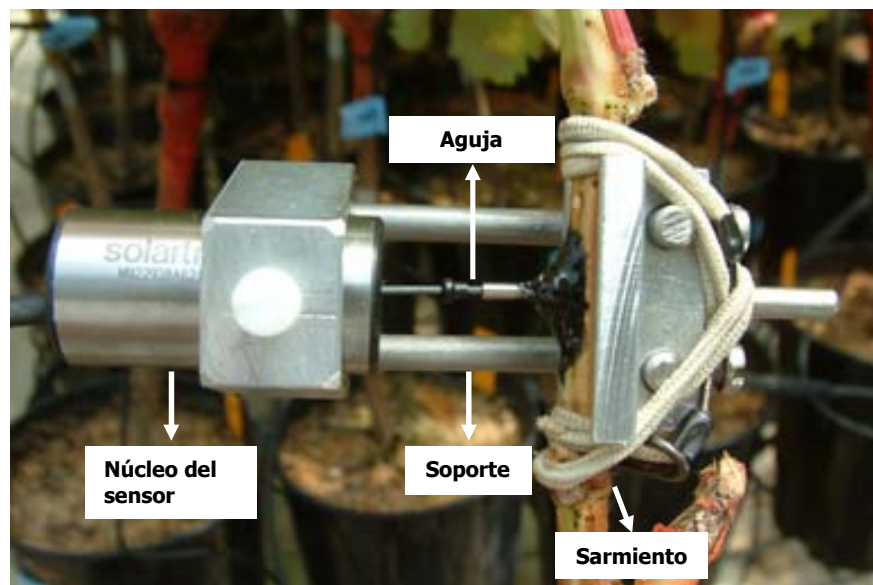


Figura 7.3 Imagen de un sensor LDVT compuesto de un núcleo cilíndrico y de una aguja metálica fijada a la base del sarmiento de la planta. El núcleo del sensor se fijó al sarmiento con ayuda de un soporte de invar-aluminio.

El crecimiento del sarmiento se expresa como el incremento de diámetro del mismo en relación al valor del primer día (cero, al iniciar las mediciones) aunque, a nivel estadístico, se analizó la variación diaria del diámetro, expresada como la diferencia entre dos días consecutivos de las medidas tomadas a las 6 de la mañana. La segunda variable estudiada, la contracción máxima diaria (CMD) se expresa como la diferencia entre el valor máximo del diámetro (que suele observarse en las primeras horas de la mañana) y el mínimo (que se suele dar en las horas centrales del día) para cada uno de los días. Las medidas de estas variables se registraron desde el 16 de Junio (un día después de la inoculación) hasta el 30 de Septiembre (un día antes de que se desmontase el experimento).

Las medidas fisiológicas en hoja se realizaron a mediodía (hora oficial), en días soleados y coincidiendo con el último día del periodo de estrés. La conductancia estomática se midió mediante un porómetro (modelo LI-1600 de Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.) y el potencial hídrico foliar (Ψ_f) se midió con una cámara de presión de Scholander (Soilmoisture 3005, Soil Moisture Corp., Santa Barbara, California, EE.UU.). Las medidas se realizaron sobre cinco hojas bien desarrolladas y sanas, seleccionadas al azar, para cada uno de los grupos experimentales. Para estas medidas no se incluyeron las plantas con sensor, evitando así alteraciones en las mediciones registradas por el *datalogger*. En primer lugar, se realizaron las medidas de conductancia estomática en el invernadero y, posteriormente, se recogieron esas mismas hojas para realizar las medidas del Ψ_f en el laboratorio. Las hojas se transportaron en cajas herméticas, envueltas en bayetas húmedas y protegidas de la luz. Una vez en el laboratorio, se extrajeron de una en una y se cortó una pequeña fracción del pecíolo para introducirlas en la cámara de Scholander y proceder a la lectura del Ψ_f . Durante el periodo experimental, se llevaron a cabo un total de nueve mediciones con una periodicidad aproximada de dos semanas.

La longitud de las necrosis, indicador del desarrollo fúngico en la planta, se midieron al finalizar el experimento, transcurridos tres meses y medio desde la inoculación y en las 32 plantas dotadas con sensor. Para medir las lesiones internas se eliminó la corteza y los tejidos subyacentes con ayuda de un bisturí y se anotó la longitud de la zona necrótica. Finalmente, se tomaron fragmentos de los tejidos afectados para reaislar el hongo inoculado. Los reaislamientos se realizaron según el procedimiento estándar explicado anteriormente (ver capítulo 4).

El experimento se prolongó durante cuatro meses y se desarrolló desde el 1 de Junio hasta el 1 de Octubre de 2007. Durante este periodo, se recopilaron los datos diarios de temperatura de una estación meteorológica automática, situada a 260 m del invernadero.

7.2.5 Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa Statistica versión 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE.UU.). En primer lugar, se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos de cada una de las variables y se aplicó la transformación de la raíz cuadrada, cuando fue necesario, para cumplir con estos dos requisitos (Quinn y Keough, 2002). Las variables del crecimiento vegetal (incremento del diámetro y CMD) se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas y las variables fisiológicas (conductancia estomática y potencial hídrico) se trataron como medidas independientes a lo largo del tiempo. En primer lugar, los parámetros de crecimiento se sometieron a la prueba de esfericidad de Mauchly para establecer si el tiempo tuvo un efecto significativo sobre los datos. Cuando no se pudo asumir la esfericidad, se aplicó la corrección de Huynh-Feldt a la significación de los factores estrés hídrico y patógeno. El análisis del crecimiento en diámetro se dividió en tres periodos debido a la diferente evolución de los datos a lo largo del tiempo. El primer periodo estuvo compuesto por los datos recogidos del 16/Jun al 05/Jul, el segundo del 06/Jul al 31/Jul y el tercero del 01/Ago al 30/Sep. Por el mismo motivo, la variable CMD se fraccionó en dos periodos. El primero transcurrió del 16/Jun al 10/Jul y el segundo del 11/Jul al 30 Sep. Los parámetros fisiológicos se analizaron en bloques aleatorios

para reducir el posible efecto del tiempo sobre los datos. Para el análisis de la longitud de la necrosis, se realizó un ANOVA factorial. Por último, y para todas las variables, se llevó a cabo el test de Tukey que permitió identificar las diferencias entre las medias de cada grupo.

7.3 RESULTADOS

En la [Tabla 7.1](#) se detallan los efectos, tanto aislados como combinados, del estrés hídrico y de la inoculación con *Neofusicoccum parvum* sobre las seis variables analizadas.

7.3.1 Crecimiento vegetal

Globalmente, el crecimiento en diámetro de las plantas se vio afectado significativamente por el estrés hídrico ($p = 0,02$) aunque el patógeno no tuvo un efecto significativo ($p = 0,99$) ([Tabla 7.2](#)). La combinación de ambos factores no mostró una interacción significativa sobre el crecimiento ($p = 0,75$) y las plantas estresadas crecieron, de media, menos que las no estresadas ([Tabla 7.1](#)). El análisis de Mauchly mostró que no se puede asumir la esfericidad de los datos ($p < 0,01$) y, en la corrección de Huynh-Feldt, también aparece un efecto significativo del tiempo, así como de su interacción con el estrés (ambos $p < 0,01$) ([Tabla 7.2](#)).

Tabla 7.1 Valores medios de las diferentes variables analizadas para cada uno de los grupos experimentales. Las letras indican los rangos de significación para el test de Tukey dentro de cada variable. La significación para la contracción máxima diaria está dividida según el factor estrés.

	Estresadas inoculadas	Estresadas no inoculadas	No estresadas inoculadas	No estresadas no inoculadas
Incremento del diámetro (μm)	241,1 b	258,1 b	323,4 a	316,4 a
Contracción máxima diaria (μm)	29,2 B	37,2 A	21,6 b	22,7 a
Conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	23,7 d	47,1 c	188,1 b	241,8 a
Potencial hídrico (MPa)	- 1,27 d	- 1,14 c	- 0,91 b	- 0,78 a
Longitud de la necrosis (cm)	5,5 a	0,7 b	4,2 a	0,6 b

Tabla 7.2 Resultados de los ANOVA para los efectos intra-sujetos (**a**) e inter-sujetos (**b**) después de la corrección de Huynh-Feldt de la variable del incremento del diámetro. Valor del estadístico (F) y significación (p).

a Intra-sujetos	gl	Total		Fase I		Fase II		Fase III	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Tiempo	30,18	30,18	< 0,01	45,81	< 0,01	16,77	< 0,01	63,71	< 0,01
Tiempo * Inoculación de <i>N. parvum</i>	30,18	0,93	0,50	1,44	0,24	0,62	0,72	0,88	0,52
Tiempo * Estrés hídrico	30,18	16,87	< 0,01	24,67	< 0,01	16,11	< 0,01	8,56	< 0,01
Tiempo * Inoculación * Estrés	30,18	0,56	0,82	1,45	0,23	0,31	0,93	1,73	0,11
b Inter-sujetos	gl	Total		Fase I		Fase II		Fase III	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Inoculación de <i>N. parvum</i>	1	< 0,01	0,99	2,91	0,10	4,97	0,03	0,24	0,63
Estrés hídrico	1	5,99	0,02	3,38	0,08	1,46	0,24	0,02	0,89
Inoculación * Estrés	1	0,10	0,75	0,12	0,73	0,14	0,71	0,55	0,47

En el transcurso del ensayo, el diámetro del sarmiento tuvo un comportamiento variable entre los distintos grupos experimentales. En el gráfico del incremento del diámetro se observaron tres fases: 1) fase de crecimiento (16/Jun-05/Jul), 2) fase de reducción (06/Jul-31/Jul) y 3) fase constante (01/Ago-30/Sep) (Figura 7.4). En los primeros 20 días tras la inoculación (fase I), el incremento absoluto en diámetro tuvo un valor cercano a los 0,5 mm de media. En esta primera fase, ninguno de los factores tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento (Tabla 7.2b) aunque, en la Figura 7.4 se observa que las vides estresadas mostraron un crecimiento ligeramente superior al de las no estresadas. Durante la segunda fase, todas las plantas decrecieron y la inoculación con el patógeno afectó significativamente ($p = 0,03$), con un decrecimiento más brusco y anterior en el tiempo de las plantas inoculadas (Figura 7.4). Aunque el factor estrés no fue significativo ($p = 0,24$), en la Figura 7.4 se observa que, entre el 06/Jul y el 16/Jul, las plantas estresadas, independientemente del factor inoculación, comenzaron a reducir su diámetro (unos 0,3 mm de media), mientras que las plantas no estresadas continuaron creciendo. La reducción de las plantas no estresadas fue de 0,2 mm y su caída se prolongó durante unos 15 días (del 15/Jul al 1/Ago). La diferencia establecida entre el diámetro de ambos grupos (0,1 mm) se mantuvo, más o menos, constante

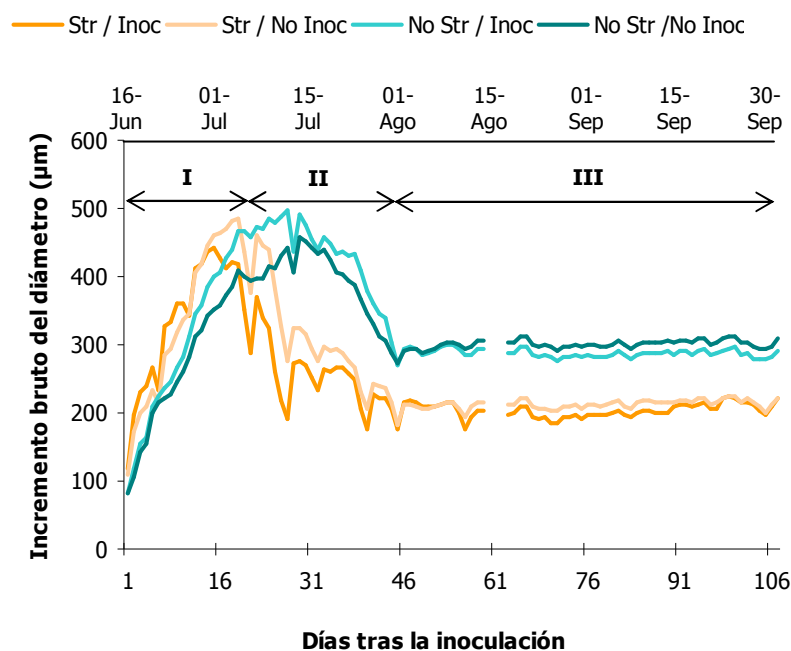


Figura 7.4 Evolución de la variable del incremento del diámetro del sarmiento en los cuatro grupos experimentales. La discontinuidad de los trazos se debe a la pérdida de datos de cuatro días. En la parte superior del gráfico se destacan las diferentes fases en las que se dividió el análisis estadístico y el periodo en el que se realizaron las medidas. Leyenda del gráfico: Str/Inoc (grupo de las plantas estresadas e inoculadas), Str/No Inoc (estresadas y no inoculadas), No Str/Inoc (no estresadas e inoculadas) y No Str/No Inoc (no estresadas y no inoculadas).

durante la tercera fase, aunque en ésta no hubo un efecto significativo de ninguno de los dos factores ([Tabla 7.2b](#)). La interacción entre la inoculación y el estrés no fue significativa en ninguna de las fases en que se dividió el experimento.

Las contracciones máximas diarias (CMD) también mostraron, a lo largo del ensayo, un comportamiento variable entre grupos. A nivel general, el estrés hídrico y el patógeno tuvieron una influencia significativa ($p < 0,01$ para ambos) ([Tabla 7.3b](#)). En este caso, la interacción entre factores fue positiva ($p < 0,01$), con mayores CMD en las vides estresadas y no inoculadas ([Tabla 7.1](#)). A lo largo del periodo experimental, se reconocen dos fases en las que las CMD se comportaron de forma diferente: 1) del 16/Jun al 10/Jul, con contracciones grandes y 2) del 11/Jul al 30/Sep, con contracciones progresivamente menores

(Figura 7.5). A nivel estadístico se observa que, en la primera fase, tanto el patógeno como el estrés tuvieron un efecto significativo mientras que, en la segunda fase, sólo el estrés hídrico se mostró significativo (Tabla 7.3b).

Tabla 7.3 Resultados de los ANOVA para los efectos intra-sujetos (a) e inter-sujetos (b) después de la corrección de Huynh-Feldt de la variable de la contracción máxima diaria. Valor del estadístico (F) y significación (p).

a Intra-sujetos	gl	Total		Periodo I		Periodo II	
		F	p	F	p	F	p
Tiempo	19,30	19,30	< 0,01	16,28	< 0,01	25,86	< 0,01
Tiempo * Inoculación de <i>N. parvum</i>	19,30	1,64	0,172	1,30	0,25	0,63	0,65
Tiempo * Estrés hídrico	19,30	7,37	0,02	12,38	< 0,01	5,56	< 0,01
Tiempo * Inoculación * Estrés	19,30	1,93	0,112	2,14	0,04	0,96	0,44

b Inter-sujetos	gl	Total		Periodo I		Periodo II	
		F	p	F	p	F	p
Inoculación de <i>N. parvum</i>	1	18,26	< 0,01	5,40	0,03	3,53	0,08
Estrés hídrico	1	23,58	< 0,01	5,10	0,04	13,24	0,02
Inoculación * Estrés	1	10,79	< 0,01	3,25	0,09	1,53	0,23

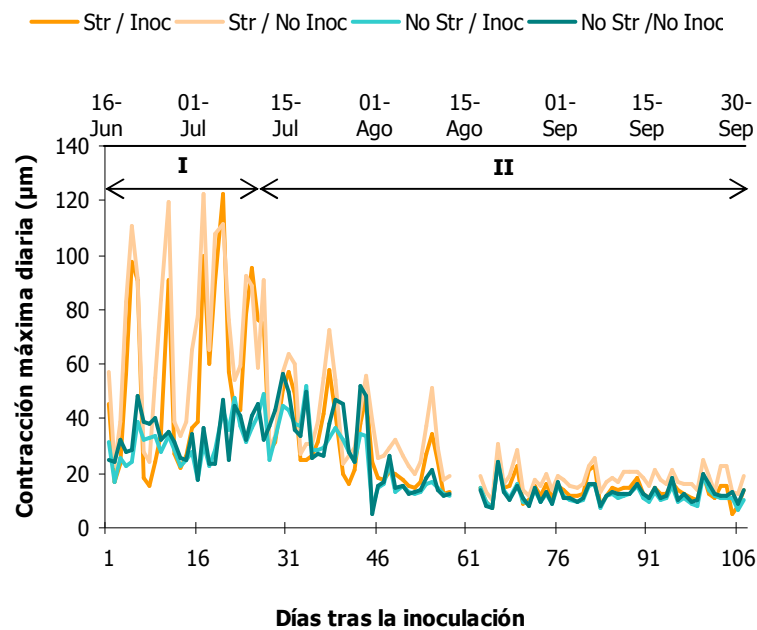


Figura 7.5 Evolución de la variable de la contracción máxima diaria. La discontinuidad de los trazos se debe a la pérdida de datos de cuatro días. En la parte superior del gráfico se destacan las diferentes fases en las que se dividió el análisis estadístico y el periodo en el que se realizaron las medidas. Leyenda del gráfico: Str/Inoc (grupo de las plantas estresadas e inoculadas), Str/No Inoc (estresadas y no inoculadas), No Str/Inoc (no estresadas e inoculadas) y No Str/No Inoc (no estresadas y no inoculadas).

En el gráfico se observa que en los 28 primeros días tras la inoculación (fase I), las CMD de las plantas estresadas hídricamente fueron mucho mayores que las de las plantas no estresadas. En esta primera fase, las oscilaciones de las CMD de las plantas estresadas superaron frecuentemente los 100 μm y, dentro de este grupo, las no inoculadas registraron las mayores CMD. En la fase II, las contracciones fueron menores, oscilando entre las 20 μm y las 50 μm , y, de nuevo, en las vides estresadas y no inoculadas se midieron las mayores fluctuaciones.

La fase I de las CMD ([Figura 7.5](#)) comprende casi la totalidad del periodo de las fases I y II del crecimiento del sarmiento ([Figura 7.4](#)). Es decir, durante las fases de crecimiento y decrecimiento de las vides, las CMD fueron grandes, para reducirse posteriormente y alcanzar una fase de estabilidad para ambas variables cuando se detuvo el crecimiento de las plantas, ya bien entrado el verano.

7.3.2 Relaciones hídricas

El estrés hídrico y el patógeno ejercieron una influencia significativa sobre la conductancia estomática y el potencial hídrico ($p < 0,01$ en todos los casos) ([Tabla 7.4](#)). Sin embargo, la combinación de ambos factores no tuvo una interacción significativa para ninguno de los dos parámetros. En general, los valores de ambas variables en las plantas no sometidas a estrés hídrico fluctuaron más que los de las estresadas, que mostraron valores siempre menores y más constantes en todas las mediciones. La conductancia estomática de las plantas no estresadas fluctuó 321 unidades de media, mientras que las plantas estresadas lo hicieron en 96 unidades. En cuanto al potencial hídrico, la fluctuación de las plantas no estresadas osciló 0,62 MPa y la de las estresadas, 0,45 MPa ([Figuras 7.6 a-b](#)). Las plantas no estresadas y no inoculadas registraron los mayores valores para las dos variables, mientras que las plantas estresadas e inoculadas mostraron las menores tasas ([Tabla 7.1](#)).

Tabla 7.4 Resultado de los ANOVA para los efectos inter-sujetos de las variables de la conductancia estomática y el potencial hídrico foliar. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	Conductancia estomática		Potencial hídrico foliar	
		F	p	F	p
Inoculación de <i>N. parvum</i>	1	15,21	< 0,01	18,86	< 0,01
Estrés hídrico	1	300,81	< 0,01	134,18	< 0,01
Inoculación * Estrés	1	0,12	0,73	< 0,01	0,95

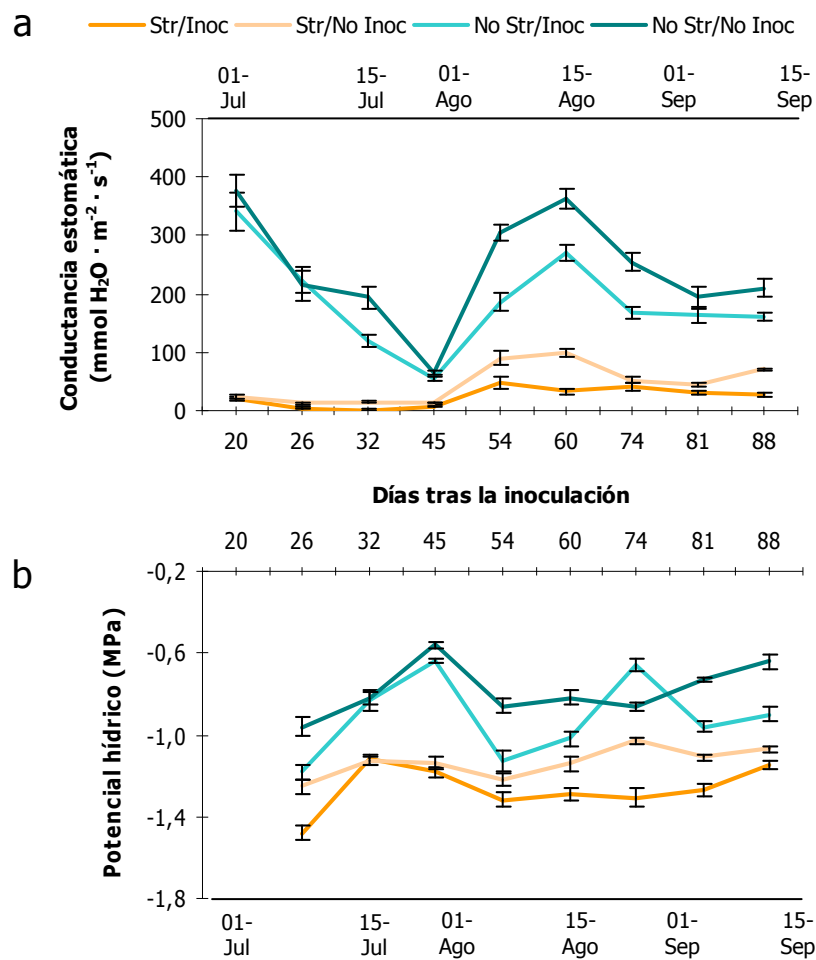


Figura 7.6 Evolución de las variables medidas en hoja en los cuatro grupos experimentales: conductancia estomática **(a)** y potencial hídrico **(b)**. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se destaca el periodo que comprenden las medidas realizadas. Leyenda del gráfico: Str/Inoc (grupo de las plantas estresadas e inoculadas), Str/No Inoc (estresadas y no inoculadas), No Str/Inoc (no estresadas e inoculadas) y No Str/No Inoc (no estresadas y no inoculadas).

Tabla 7.5 Resultado del ANOVA para la longitud de las necrosis vasculares medidas. Valor del estadístico (F) y significación (p).

	gl	F	p
Inoculación de <i>N. parvum</i>	1	62,02	< 0,01
Estrés hídrico	1	0,80	0,38
Inoculación * Estrés	1	0,39	0,54

7.3.3 Desarrollo del patógeno *Neofusicoccum parvum*

Al final del experimento, el hongo se realizó con éxito en el 95% de las plantas inoculadas. Las vides no inoculadas mostraron en todos los casos heridas bien cicatrizadas que no alcanzaron el centímetro de longitud (Tabla 7.1). Las necrosis causadas por *N. parvum* en las plantas estresadas fueron ligeramente superiores a las medidas en plantas no estresadas (5,5 cm frente a 4,2 cm) aunque sin significación estadística ($p = 0,38$). La interacción entre ambos factores tampoco fue significativa ($p = 0,54$) (Tabla 7.5).

7.4 DISCUSIÓN

El estrés hídrico y la inoculación con *Neofusicoccum parvum* afectaron a la fisiología y al crecimiento de la vid en diferente medida según la variable analizada. Tanto el estrés como el patógeno disminuyeron la conductancia estomática y el potencial hídrico, sin que la combinación de ambos factores agravase significativamente las alteraciones observadas. El crecimiento en diámetro de las vides disminuyó sólo por efecto del estrés hídrico, sin que el patógeno afectase significativamente o se diese interacción entre ambos factores. Por último, estrés hídrico e inoculación provocaron unas contracciones mayores de los tejidos del sarmiento, con un efecto combinado en el que las vides estresadas y no inoculadas mostraron las mayores contracciones.

Según Cifre et al. (2005), una conductancia estomática de entre 50 y 100 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ es característica de una situación de estrés hídrico moderado, lo que confirma que las vides del experimento sometidas a un riego deficiente sufrieron estrés hídrico. Este déficit

hídrico causó alteraciones significativas tanto en la fisiología como en el crecimiento de las vides sometidas a estrés. Los sensores LDVT detectaron un menor crecimiento de las vides con riego limitado posiblemente asociado a la disminución en la conductancia estomática de estas plantas.

Los valores registrados por los sensores LDVT indicaron un periodo de crecimiento activo de todas las vides en los primeros días tras la inoculación. La falta de agua provocó que el crecimiento de las vides estresadas se detuviese 10 días antes que el de las regadas de forma adecuada. Tras esta fase de crecimiento, todas las plantas decrecieron, lo que podría explicarse como un cambio adaptativo de la propia planta a los rigores del verano típicos del clima mediterráneo (Mooney 1983). Transcurridos 45 días desde las inoculaciones, se establecieron unas diferencias en el diámetro del sarmiento entre las vides estresadas y no estresadas que se mantuvieron constantes hasta el final del experimento. Las grandes contracciones diarias mostradas por las plantas con déficit hídrico al inicio del experimento podrían considerarse como adaptativas, ya que al aumentar el estrés hídrico se produce una pérdida gradual de las reservas internas de agua de la planta (Huguet et al. 1992).

La acción de *N. parvum* produjo efectos importantes tanto en la fisiología de las plantas como en su crecimiento. La presencia del patógeno redujo la conductancia estomática y aumentó el potencial hídrico foliar de las vides inoculadas. Resultados similares obtuvieron Ragazzi et al. (1999) al inocular *Diplodia mutila* en plantas de semillero de dos especies de roble.

Según diversos autores, la reducción en el crecimiento es uno de los primeros síntomas del estrés causado por un patógeno (Schoch et al. 1989; Katerji et al. 1990). En nuestro caso, el crecimiento en diámetro sólo se vio reducido significativamente por el estrés hídrico. *Neofusicoccum parvum*, sin embargo, sólo redujo significativamente el crecimiento en el periodo intermedio del ensayo, cuando se observó una reducción global del diámetro de las

plantas en todos los grupos. Así mismo, las contracciones máximas diarias del sarmiento se hicieron más patentes al inicio de la infección y en respuesta tanto al estrés hídrico como al patógeno. Existen trabajos previos que demuestran, mediante sensores LDVT, las alteraciones negativas causadas por el patógeno *Diplodia corticola*. En uno de estos estudios, Luque et al. (1999) demostraron que *D. corticola* producía paralización del crecimiento y un aumento de las contracciones máximas del tallo en plantas de alcornoque. En otro estudio similar, este patógeno causó lesiones en los vasos conductores del xilema de plantas de *Cistus* que alteraron el flujo regular de agua, provocando una respuesta en la planta similar a la causada por la falta de agua (Cohen et al. 1997).

Algunos estudios apoyan la teoría de que el estrés hídrico agrava los síntomas o de que incluso aumentan la virulencia del patógeno. Por ejemplo, en alcornoques infectados con *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze los síntomas generados por el hongo en plantas estresadas se acentúan en relación con las no estresadas hídricamente (Jacobs et al. 1993). En nuestro caso, la interacción estrés/patógeno sólo se observó en la contracción máxima diaria del sarmiento. Una posible explicación es que en las vides inoculadas se viese reducida la circulación de agua a través de los tejidos afectados por el patógeno y, por tanto, tendrían contracciones menores en relación con las plantas no inoculadas. La explicación viene apoyada también por la reducción observada en el potencial hídrico foliar de las plantas inoculadas.

Diversos autores afirman que el efecto patogénico de algunos hongos puede aparecer cuando el vigor de la planta se reduce. Tal sería el caso de *B. mediterranea* que mostraría su virulencia en plantas estresadas (normalmente por el estrés hídrico) (Ragazzi et al. 1989; Vannini et al. 1991). El estrés hídrico puede ser un factor de predisposición mayor en infecciones causadas por *Botryosphaeria dothidea* en pistachero (Ma et al. 2001). Otro ejemplo es el caso de *Diplodia pinea*, que se mostró más agresiva cuando se inoculó en ejemplares de *Pinus resinosa* Ait. sometidos a estrés hídrico (Blodgett et al. 1997a; Blodgett et al. 1997b). Existen otros casos en los que el estrés hídrico provoca el efecto inverso sobre el desarrollo del

patógeno. Por ejemplo, un menor riego sobre plantas de alfalfa provocó que éstas estuvieran menos afectadas por *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold que las control (Pennypacker et al. 1991). Otro ensayo demostró que el hongo *Phytophthora cinnamomi* redujo su crecimiento ante potenciales hídricos bajos en *Quercus rubra* L. (Marçais et al. 1993). En nuestro ensayo, el estrés hídrico inducido no tuvo un efecto directo sobre el desarrollo de *Neofusicoccum parvum* en las vides inoculadas y, en general, la interacción patógeno-estrés hídrico no agravó los efectos de los factores.

Se ha confirmado que en la vid, el déficit hídrico moderado mejora la productividad y la calidad de la cosecha, ya que evita la competencia por los metabolitos entre las estructuras vegetativas y reproductivas (Dry y Loveys 1998). Sin embargo, la acción simultánea de una infección patogénica y de un estrés abiótico podrían actuar sinérgicamente y reducir la capacidad de respuesta de la planta ante estos factores adversos (Ayres 1991). Según Houston (1984), una de las medidas de control más efectivas en enfermedades de decaimiento sería prevenir las causas que provocan el estrés más que combatir los organismos secundarios que causan la mortalidad. En nuestro ensayo se ha demostrado que la infección fúngica y el déficit hídrico causan, de forma aislada, una alteración importante en el huésped. *Neofusicoccum parvum* causa lesiones importantes con o sin estrés hídrico, lo que demuestra que este hongo no es un patógeno de debilidad y que no necesita que la planta esté afectada por un factor adverso para causar daños. Será necesario plantear nuevos estudios para averiguar si, en un estadio más avanzado de la infección, se producen efectos sinérgicos entre ambos factores.

7.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1969). Plant Pathology. APS Press, New York (EE.UU.). 629 pp.
- Ayres, P. G. (1991). Growth Responses Induced by Pathogens and Other Stresses. In: *Response of Plants to Multiple Stresses*. Mooney, H. A., Winner, W. E. and Pell, E. J. (Eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California (EE.UU.). 422 pp.
- Blodgett, J. T., Kruger, E. L. y Stanosz, G. R. (1997a). Effects of moderate water stress on disease development by *Sphaeropsis sapinea* on red pine. *Phytopathology* 87, 422-428.
- Blodgett, J. T., Kruger, E. L. y Stanosz, G. R. (1997b). *Sphaeropsis sapinea* and water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. *Phytopathology* 87, 429-434.

- Braun, P. y Schmid, J. (1999). Sap flow measurements in grapevines (*Vitis vinifera* L.) 1. Stem morphology and use of the heat balance method. *Plant and Soil* 215, 39-45.
- Cohen, M., Luque, J. y Álvarez, I. F. (1997). Use of stem diameter variations for detecting the effects of pathogens on plant water status. *Annales des Science Forestières* 54, 463-472.
- Dry, P. R. y Loveys, B. R. (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4, 140-148.
- Escalona, J. M., Flexas, J. y Medrano, H. (1999). Stomatal and non-stomatal limitations photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 421-433.
- Hoagland, D. y Aron, D. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347. Berkeley (EE.UU.). 32 pp.
- Houston, D. R. (1984). Stress related to diseases. *Arboricultural Journal* 8, 137-149.
- Huguet, J. G., Li, S. H., Lorendeau, J. Y. y Pelloux, G. (1992). Specific micromorphometric reactions of fruit trees to water stress and irrigation scheduling automation. *Journal of Horticultural Science* 67, 631-640.
- Intrigliolo, D. S. y Castel, J. R. (2007). Evaluation of grapevine water status from trunk diameter variations. *Irrigation Science* 26, 49-59.
- Jacobs, K. A., Colinas, C. y Álvarez, I. F. (1993). Pathogenicity of three decline fungi on water-stressed cork oak. *Phytopathology* 83, 1352.
- Katerji, N., Schoch, P. G., Rimgoto, P. y L'Hotel, J. C. (1990). Diagnostic des périodes de contrainte hydrique chez des plantes d'aubergines cultivées en serre, au moyen des microvariations des tiges. *Agronomie* 10, 541-549.
- Koide, R. T., Robichaux, R. H., Morse, S. R. y Smith, C. M. (1989). Plant water status, hydraulic resistance and capacitance. In: *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Pearcy, R. W., Ehleringer, J., Mooney, H. A. y Rundel, P. W. (Eds.). Chapman and Hall. New York (EE.UU.). 457 pp.
- Luque, J., Cohen, M., Savé, R., Biel, C. y Álvarez, I. F. (1999). Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Annales des Science Forestières* 56, 19-26.
- Ma, Z., Morgan, D. P., Michailides, T. J. (2001). Effects of water stress on botryosphaeria blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 85, 745-749.
- Marçais, B., Dupuis, F. y Desprez-Loustau, M. L. (1993). Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra*) to *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Forest Pathology* 23, 295-305.
- Mooney, H. A. (1983). Carbon-gaining capacity and allocation patterns of Mediterranean-climate plants. In: *Mediterranean-Type Ecosystems. The role of nutrients*. Kruger, F. J., Mitchell, D. T. y Jarvis, J. U. M. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin (Alemania). 552 pp.
- Pearcy, R. W., Schulze, E. D., y Zimmerman, R. (1989). Measurement of transpiration and leaf conductance. In: *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Pearcy, R. W., Ehleringer, J., Mooney, H. A. y Rundel, P. W. (Eds.). Chapman and Hall. New York (EE.UU.). 457 pp.
- Pennypacker, B. W., Leath, K. T. y Hill, R. R. (1991). Impact of drought stress on the expression of resistance to *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. *Phytopathology* 81, 1014-1024.
- Pusey, P. L. (1989). Influence of water stress on susceptibility of nonwounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 73, 1000-1003.
- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge (Gran Bretaña). 537 pp.
- Ragazzi, A., Dellavalle, I. y Mesturino, L. (1989). The oak decline: a new problem in Italy. *European Journal of Forest Pathology* 19, 105-110.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Vagniluca, S., Comparini, C. y Dellavalle, I. (1999). Leaf water potential and peroxidase activity in *Quercus cerris* y *Quercus pubescens* after inoculation with *Diplodia mutila*. *Journal of Phytopathology* 147, 55-59.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1992). Compromiso entre fotosíntesis y transpiración. En: *Fisiología de las Plantas*. Paraninfo Tomson Learning. Thomson Editores Spain. Madrid (España). 985 pp.

- Schoch, P. G., L'Hotel, J. C., Dauple, G., Conus, G. y Fabre, M. J. (1989). Microvariations de diameter de tige pour le pilotage de l'irrigation. *Agronomie* 9, 137-142.
- Shain, L. (1995). Stem defense against pathogens. In: *Plant Stems. Physiology and Functional Morphology*. Gartner, B. (Ed.). Academic Press, San Diego (EE.UU.). 440 pp.
- Tyree, M. T. y Ewers, F. W. (1991). The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119, 345-360.
- Vannini, A. y Scarascia, G. (1991). Water stress: a predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. *European Journal of Forest Pathology* 21, 193-201.
- Wargo, P. M. (1996). Consequences of environmental stress on oak: predisposition to pathogens. *Annales des Science Forestières* 53, 359-368.

CONCLUSIONES GENERALES

- Yesca, eutipiosis y brazo muerto, las tres enfermedades de madera de la vid que causan mayor impacto económico en el sector vitivinícola, están presentes en Cataluña. En particular, la enfermedad del brazo muerto es una patología ampliamente distribuida en este territorio.

- La concomitancia de síntomas internos de varias enfermedades sobre una misma planta impide asociar de forma unívoca un síntoma externo con determinados síntomas internos. Sin embargo, sí se puede asociar, de forma general, la aparición de un determinado síntoma interno con la actividad de un hongo concreto.

- De forma mayoritaria, las punteaduras necróticas se asocian con el hongo *Phaeomoniella chlamydospora*, la pudrición blanda con *Fomitiporia mediterranea* y la necrosis sectorial con los hongos *Diplodia seriata* y *Eutypa lata*. La necrosis central no se asocia a un hongo concreto, pudiéndose aislar mayoritariamente de ella *Di. seriata*, *E. lata* y *Pa. chlamydospora*.

- Se han aislado e identificado seis especies de la familia Botryosphaeriaceae en los viñedos muestreados; de mayor a menor abundancia: *Di. seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella viticola*, *N. luteum* y *N. vitifusiforme*.

- La técnica de la PCR cooperativa y el revelado colorimétrico con sonda de hibridación se aplicaron con éxito en la detección de un grupo de siete especies de Botryosphaeriaceae procedentes de vid.

- Se confirma la capacidad de cinco especies de Botryosphaeriaceae para producir toxinas en medio líquido artificial. Todas las especies formaron compuestos hidrofílicos de elevado peso molecular y de carácter fitotóxico. *Neofusicoccum parvum* produjo toxinas de naturaleza polisacárida, formadas principalmente por glucosa, manosa y galactosa. Las especies *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* produjeron también fitotoxinas lipofílicas de bajo peso molecular, no detectadas en el resto de especies.

- La caracterización patogénica de seis especies de Botryosphaeriaceae destacó la gran virulencia de *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*. *Botryosphaeria dothidea* mostró una virulencia media mientras que *Dothiorella viticola* y *N. vitifusiforme* fueron las especies menos virulentas. La gran variabilidad intraespecífica mostrada por *Diplodia seriata* no dejó clara su virulencia en vid.

- De los portainjertos de vid comúnmente utilizados en Cataluña, Ru140 fue el menos susceptible a las especies de Botryosphaeriaceae mientras que 41B fue el más sensible a las dos especies más virulentas, *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum*. Las seis variedades de uva ensayadas mostraron una susceptibilidad muy similar, aunque Garnacha fue más sensible a *N. luteum* y Macabeo a *N. parvum*.

- Algunas especies vegetales de leñosas que comparten hábitat con el cultivo de la vid podrían actuar como huéspedes secundarios de Botryosphaeriaceae. Las más sensibles a distintas especies de Botryosphaeriaceae fueron el almendro, la encina, la jara, el melocotonero y el nogal, mientras que el olivo, el pino y el romero fueron las menos susceptibles.

- El estrés hídrico y la inoculación con *Neofusicoccum parvum* afectaron negativamente a las relaciones hídricas y al crecimiento de las plantas de vid. Ambos factores disminuyeron la conductancia estomática y el potencial hídrico foliar, aunque la combinación de ellos no agravó de forma significativa las alteraciones observadas. El crecimiento en diámetro

de las vides disminuyó significativamente sólo por efecto del estrés hídrico, sin que el patógeno o la interacción de ambos factores afectase a esta variable.

Descripción morfológica de las especies de Botryosphaeriaceae empleadas en los diferentes capítulos

Abreviaturas

d: días.

diam: diámetro.

DS: desviación estándar de la media.

n: tamaño muestral.

OA (Oat Agar): agar con extracto de avena.

PDA (Potato Dextrose Agar): agar con extracto de patata.

Ratio L/A: relación longitud/anchura.

Botryosphaeria dothidea (Moug.: Fr.) Ces. & De Not. Comm. Soc. Crittog. Ital. 1: 215. 1863.
≡ *Sphaeria dothidea* Moug.: Fr., Syst. Mycol. 2: 423. 1823.
= *Botryosphaeria berengeriana* De Not., Sferiac. It. 1863.
Anamorfo: ***Fusicoccum aesculi*** Corda in Sturm, Deutschland Flora 2: 111. 1829.

Las descripciones del teleomorfo y anamorfo corresponden a las notas incluidas en Phillips, Phytopathologia Mediterranea 41: 8. 2002.

Ascoma inicialmente inmerso, aislado o en grupos, en complejos estromáticos multiloculares. Lóculos individuales de 180-250 µm de diam, pared *textura angularis* gruesa y oscura, tornándose más pálida y delgada hacia el interior, contenido blanco cuando está seco y con un ostíolo perifisado. Ascas bitunicadas, claviformes, estipitadas, de 84–176 X 16–24 µm, con 8 esporas por asca, irregularmente biseriadas. Ascósporas de elipsoides a claramente fusoides, más anchas hacia la mitad o en el tercio superior, hialinas, lisas, de pared delgada, unicelulares, estrechándose en una base obtusa y en el ápice, multigutuladas de (15–) 18,0–25,5 (–28) X (6–) 7,5–12,0 (–14) µm. Pseudoparáfisis hialinas, septadas, ramificadas, de 2–3,5 µm de ancho.

Conidioma a menudo desarrollado en el mismo estroma que el ascoma, la mayoría de las veces aislado aunque ocasionalmente agregado y confluyente en un estroma único, externamente negro y con pared *textura angularis* gruesa que se vuelve progresivamente más pálida y delgada hacia las capas interiores. Conidióforos hialinos, cilíndricos, lisos, ramificados en la base, con 0-1 septo, de dimensiones 14–24 X 2–3 μm y que revisten completamente el lóculo. Células conidiógenas inicialmente holoblásticas, posteriormente enteroblásticas, integradas, hialinas, lisas, cilíndricas, produciendo uno o más conidios apicales, proliferando a menudo de forma percurrente dando lugar a conidios en niveles sucesivamente más altos, en células conidiógenas anilladas o proliferando al mismo nivel, lo que genera engrosamientos periclinales. Conidios hialinos, de pared delgada, lisos, de fusiformes a elíptico-fusiformes, rectos, con vértice subobtusado, base truncada que presenta una pequeña parte de la pared de la célula conidiógena adosada, de 19,5–27(–30) X 4,5–6 μm , (media \pm DS = 23,5 \pm 2,1 X 5,8 \pm 0,5 μm ; n = 50) y ratio L/A de 4,1.

Colonias en PDA inicialmente blancas, con abundante micelio aéreo que se vuelve de gris a gris oscuro, gradualmente. La cara inferior de las colonias, primero blanca, vira tras 2-3 d del verde oscuro al verde oliva en la zona central. Esta coloración gradualmente se extiende hacia el borde y se oscurece desde el centro hasta que toda la parte inferior de la colonia se vuelve negra. Conidioma multilocular liberando los conidios tras 8 d a 25° C en OA. Conidios de fusiformes a elíptico-fusiformes con un vértice subobtusado y una base truncada que presenta una pequeña parte de la pared de la célula conidiógena adosada, de (18–) 21–28,5 (–30) X (3,5–) 4–4,5 (–6) μm , (media \pm DS = 24,7 \pm 1,9 X 4,4 \pm 0,4 μm ; n = 50) y ratio L/A de 3,8–6,3, (media \pm DS = 5.3 \pm 0.6). Los conidios no se septan ni se oscurecen con la edad. Raramente se observan microconidios.

Diplodia mutila Fr. in Montagne, Ann. Sci. Nat. II. 1: 302. 1834.

Basiónimo: *Sphaeria mutila* Fries, Syst. Mycol. 2: 424–425. 1823.

= *Sphaeropsis malorum* (Berk.) Berk. Outlines British Fungology 316. 1860.

= *Diplodia quercina* West. Bull. Acad. Belg. II 2: 560, N° 7. 1857.

= *Diplodia quercus* Fuckel, Symb. Myc. 170. 1869.

= *Diplodia samararum* Sacc. Mycoth. Ven. Cent. 14, n. 1396. 1879.

Teleomorfo: "***Botryosphaeria***" ***stevensii*** Shoemaker, Can. J. Bot. 42: 1299. 1964.

= *Physalospora mutila* N. Stevens, Mycologia 28: 333. 1936, como *Physalospora mutila* (Fr.) N.E. Stevens comb. nov.

Las descripciones del teleomorfo y anamorfo corresponden a las notas incluidas en Alves et al. Micologia 96: 608. 2004.

Ascoma unilocular, aislado o en grupos, inmerso, parcialmente emergente en la madurez, globoso, de más de 300 μm de diam, de marrón oscuro a negro, de pared gruesa, pared compuesta por capas externas *textura angularis* marrón oscuras y gruesas, y capas internas *textura angularis* hialinas y delgadas. Ostíolo central, circular, papilado, perifisado. Pseudoparáfisis hialinas, ramificadas, septadas, de 2-3 μm de diam. Ascas claviformes, estipitadas, bitunicadas, de 100–160 X 14–22 μm (incluyendo el estipe), con 8 esporas biseriadas por asca. Ascósporas de (24,8–) 30,8–32,1 (–36,2) X (9,5–) 11,2–11,7 (–13,4) μm , (media \pm DS = 31,5 \pm 2,3 X 11,4 \pm 0,9 μm ; n = 50) y ratio L/A de 2,8 \pm 0,3, fusiformes, más anchas hacia la mitad, ambos extremos obtusos, hialinas, de pared delgada, lisas, aseptadas, raramente volviéndose marronosas o septadas (1-2 septos) con el tiempo.

Picnidios aislados o agregados, globosos, de marrón oscuro a negro, inmersos, uniloculados, de pared gruesa compuesta por capas externas *textura angularis* de pared gruesa e internas de pared fina e hialinas. Ostíolo central y papilado. Conidióforos hialinos, ramificados, septados, lisos, cilíndricos. Células conidiógenas integradas o discretas, determinadas, cilíndricas, lisas, hialinas, de pared delgada, holoblásticas inicialmente, posteriormente con proliferación percurrente, determinada o indeterminada, con 1-2 anélicas no claras. Conidios lisos, unicelulares, cilíndricos, con extremos generalmente redondeados, algunos presentan una gran gútula central, pared lisa, gruesa, que normalmente permanece hialina incluso después de que los conidios se hayan liberado del picnidio, dimensiones de (19,5–) 20–27 (–29) X 10–14 (–15) μm , (media \pm DS = 23,1 \pm 2,7 X 11,9 \pm 1,5 μm ; n = 50). Ratio L/A en el rango de (1,5–) 1,9–2,1 (–2,3), (media \pm DS = 1,96 \pm 0,2).

Colonias en PDA de un marrón oliváceo oscuro, con micelio aéreo denso. Conidioma en OA extenso, de 1-2 mm de diam, relativamente escaso en cada placa, formándose sólo en el centro de la colonia, después de 7 d a 23° C, y liberando los conidios después de 21 d. Conidios cilíndricos, de extremos generalmente redondeados, hialinos, unicelulares, de pared lisa, de dimensiones (21,5–) 23–27 (–28,5) X (10,5–) 11–12 (–13) μm , (media \pm DS = 25,5 \pm 1,9 X 11,5 \pm 0,6). De ratio L/A en el rango de (1,8–) 2,1–2,4 (–2,6). Conidios que permanecen normalmente hialinos y aseptados incluso después de ser liberados del picnidio. Sin embargo, en algunos aislados, los conidios se tornan marrón oscuro y se septan (1 septo) ya en el interior del picnidio.

Diplodia seriata De Not., Mirom. Ital. Dec. IV, 6. 1842.

= *Diplodia profusa* De Not., Microm. Ital. Dec. IV, 8. 1842.

= *Diplodia pseudodiplodia* Fuckel, Jb. Nassau. Ver. Naturk. 23-24: 393. 1870.

Teleomorfo: "***Botryosphaeria obtusa*** (Schwein.) Shoemaker, Can. J. Bot. 42:1298. 1964.

Basiónimo: *Sphaeria obtusa* Schwein. Trans. Amer. Phil. Soc. II, 4: 220. 1832.

= *Physalospora obtusa* (Schwein.) Cooke, Grevillea 20: 86. 1892.

= *Melanops quercum* (Schwein.) Rehm. forma *vitis* Sacc. Sec. Shear, Science 31: 7481. 1910.

≡ *Physalospora cydoniae* Arnaud, Sec. Hesler, Bull Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. 379:101. 1916.

≡ *Physalospora malorum* (Peck) Shear, Mycologia 17: 100. 1925.

- *Sphaeropsis malorum* Peck nom. illeg.

Las descripciones del teleomorfo corresponden a las notas incluidas en la página web "*The Botryosphaeria site*" del Dr. A.J.L. Phillips (Univ. Nova de Lisboa, Portugal). Las del anamorfo corresponden a las notas incluidas en Phillips et al. Fungal Diversity 25: 149. 2007.

Ascoma marrón oscuro, inmerso, uniloculado, con pared *textura angularis* gruesa, marrón oscura que se vuelve más delgada e hialina hacia las capas interiores. Ascas claviformes, estipitadas, bitunicadas con endotúnica gruesa. Ascósporas hialinas y aseptadas de (23-)26-34(-38) X 7-12(-13) μm .

Picnidios aislados o agregados, confluentes, inmersos en el hospedador, parcialmente emergentes en la madurez, de marrón oscuro a negro, ostiolados, no papilados, de pared gruesa, las capas externas marrón oscuras, *textura angularis*, las internas también *textura angularis*, aunque hialinas y de pared fina. Células conidiógenas de dimensiones 3-5,5 X 7-10 (-15) μm , hialinas, de pared delgada, lisas, cilíndricas, discretas, produciendo un único conidio en el extremo, indeterminadas, con proliferación interna dando lugar a engrosamientos periclinales o proliferación percurrente formando 2-3 anélicas. Conidios de dimensiones (21,5-) 22-27 (-28) X (11-) 11,5-14,5 (-15,5) μm , con límites del 95% de confianza de = 24,3-25,4 X 12-6-13,2 μm (media \pm DS = 24,9 \pm 1,9 X 12,9 \pm 1,1 μm ; n = 50). Ratio L/A de 1,9 \pm 0,1; n = 50. Conidios inicialmente hialinos, tornándose marrón oscuro, de pared moderadamente gruesa (0,5 μm), con pared externamente lisa, rugosa en la cara interna, aseptados, ovoides, más anchos hacia la mitad, vértice obtuso, base truncada o redondeada.

Colonias en PDA marrón grisáceo con micelio aéreo denso. Conidioma que comienza a formarse en OA tras 4-5 d a 23^o C, pequeño y numeroso, disperso por la superficie del agar, de 0,2-1,0 mm de diam, con conidios que comienzan a liberarse tras 7-14 d en cultivo. Conidios cilíndricos, redondeados en ambos extremos, algunos truncados en la base, marrón oscuro cuando maduran, pared lisa en el exterior, finamente ornamentada en la cara interna, de (13-) 22-26 X (9-) 10-13 (-15) μm , (media \pm DS = 22,5 \pm 2,3 X 11,6 \pm 1,1; n = 30). Ratio L/A en el rango de (1,43-) 1,6-2,1 (-2,3), (media \pm DS = 1,9 \pm 0,2). En un mismo picnidio pueden verse tanto conidios hialinos como conidios de pared oscura.

Dothiorella viticola A.J.L. Phillips & Luque, Mycologia 97: 1118. 2005.

Teleomorfo: "***Botryosphaeria***" ***viticola*** A.J.L. Phillips & Luque, Mycologia 97: 1118. 2005.

Ascoma de marrón oscuro a negro, estromático, piriforme, aislado o en agrupaciones de más de 2 mm de diam, inicialmente inmerso en el huésped, parcialmente emergente en la madurez, de más de 240 µm de diam, de pared de más de 60 µm de grosor, *textura angularis*, marrón oscuro, con células hialinas de pared delgada en el interior. Ostíolo circular, central y papilado. Pseudoparáfisis de pared delgada, hialinas, frecuentemente septadas y ligeramente estrechadas en el septo, con una anchura de 3,5–4,5 (-5.0) µm. Ascas de 100–110 X 25–30 µm, estipitadas, claviformes de pared gruesa, bitunicadas, con una endotúnica gruesa y una cámara apical bien desarrollada, con 8 esporas irregularmente biseriadas. Ascósporas oblongas de subalargadas a ovadas, de (19–) 22,6–23,5 (-27) X (8,4–) 10,6–11,2 (-14.5) µm, (media ± DS = 23,1 ± 0,2 X 10,9 ± 0,1 µm; n = 62), la mayor parte con 1 septo, ligeramente estrechadas en el septo, marrón oscuras, de pared moderadamente gruesa, finamente rugosas en la superficie interior, a menudo de lados irregulares, más anchas desde el tercio inferior hasta la mitad de la célula apical, a menudo con un pequeño saliente redondeado en el extremo y en la base de la espora, la célula basal acaba en una base obtusa.

Picnidios separados o agregados en conjuntos de más de 2 mm de diam. Picnidios individuales de esféricos a globosos, negros e inmersos aunque parcialmente emergentes en la madurez, uniloculares, de 200–360 µm diam (media: 295 µm; n = 25), de pared ancha compuesta de tres capas: la más externa, marrón oscura con *textura angularis* de pared gruesa, la media, marrón oscura con *textura angularis* de células de pared delgada y la interna, de células hialinas de pared delgada. Ostíolo único, central, circular y papilado. Conidióforos hialinos, cilíndricos y ramificados. Células conidiógenas discretas o integradas, de cilíndricas a ampliamente lageniformes, de (5–) 8,6–9,8 (-14) X (3–) 4,4–4,9 (-7) µm, hialinas, lisas, holoblásticas, indeterminadas, proliferando al mismo nivel para formar engrosamientos periclinales o proliferando raramente de forma percurrente dando lugar a 1-2 anélicas. Conidios marrones, de oblongos a subcilíndricos, septados, en ocasiones ligeramente estrechados en el septo, de pared moderadamente gruesa, externamente lisos y finamente rugosos en el interior, extremos redondeados y, a menudo, con la base truncada, de (16–) 20,2–20,6 (-26) X (7–) 9,2–9,4 (-12) µm (media ± DS = 20,4 ± 0,1 X 9,3 ± 0,1 mm; n = 200) y ratio L/A de 2,2 ± 0,02 (n = 200).

Colonias en PDA que alcanzan 40 mm de radio tras 3 d a 25° C. Micelio aéreo abundante, con colonias algodonosas, de oscuro verde oliva a gris, oscureciéndose por el centro de la colonia a los 3 d; colonia completamente oscurecida tras 6-10 d. Picnidios producidos tras 20-30 d en cultivo a 23° C con luz negra UV (12/12 horas de fotoperiodo).

Rango de temperaturas para su crecimiento: mínimo 5° C, óptimo 20-25° C, máximo por debajo de los 35° C.

Neofusicoccum luteum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Stud. Mycol. 55: 248. 2006.

Basionimo: *Fusicoccum luteum* Pennycook & Samuels, Mycotaxon 24: 456. 1985.

Teleomorfo: "***Botryosphaeria***" ***lutea*** A.J.L. Phillips, Sydowia 54: 77. 2001.

Teleomorfo indiferenciable de *B. dothidea*. Ascoma inicialmente inmerso, posteriormente emergente a través de los tejidos del hospedador, negro, de menos de 0,5 mm de diam, uni- o multilocular, con lóculos de esféricos a ovoides, de 150–200 µm de diam. Pseudotecios y conidioma a menudo formados en el mismo estroma. Pseudotecios de cuello corto, abriéndose a través de un ostíolo no perifisado, pared compuesta por 8-12 capas, de marrón oscuro a negras, células de pared gruesa formando un pseudoparénquima *textura angularis*, de más de 60 µm de grosor, con 3-4 capas de pared delgada, células hialinas revistiendo la cavidad. Ascas bitunicadas, de cilíndricas a claviformes, estipitadas, de 84–176 X 16–24 µm, de 8 esporas, asociadas con pseudoparáfisis filamentosas. Ascósporas irregularmente biseriadas, hialinas, gutuladas, lisas, aseptadas, de ovales a claramente fusiformes, más anchas hacia la mitad o tercio superior de la ascóspora, estrechándose en la base obtusa y en el ápice, 18–22,5 (–24) X 7,5–12 µm. Pseudoparáfisis hialinas, septadas, ramificadas, 2-3,5 µm de ancho. Similar a *B. dothidea* aunque difiere en los caracteres anamórficos formados en cultivo, de los cuales, la formación de un pigmento amarillo es el más característico.

Conidioma euestromático, aislado o agrupado, de marrón oscuro a negro, uni- o multilocular inmerso en el hospedador, subperidermal. Lóculos de más de 150 µm de diam, de paredes *textura angularis* marrón oscuro, que disminuyen en tamaño y con la pared más delgada e hialina hacia la región conidiógena. Ostíolos papilados y circulares. Conidióforos hialinos, lisos, de pared delgada, raramente ramificados en la base, cilíndricos, formados por células de la pared interna del lóculo, de 8–19 X 3–4 µm. Células conidiógenas discretas, integradas, hialinas, lisas, cilíndricas, formando un primer conidio holoblástico y los siguientes enteroblásticos, proliferando de forma percurrente con 2-3 proliferaciones no claras, o bien, determinadas, con fiálides típicas y engrosamientos periclinales (*sensu* Sutton 1980, *The Coelomycetes*), de (6–) 8–16 (–18) X (2,5–) 3–4 (–4,5) µm. Conidios hialinos, de pared delgada, aseptados, lisos, fusiformes, más anchos en la parte central o en el tercio superior del conidio, ápice subobtusos, base truncada, a menudo con una pequeña parte de pared de la célula conidiógena residual y con un rango de tamaño de (12–) 16,5–22,5 (–24) X 4,5–6 (–7,5)

μm , (media \pm DS = $17,5 \pm 2,2 \times 5,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$; n = 115), ratio L/A de (1,8–) 2,0–3,0 (–4,0), (media \pm DS = $2,8 \pm 0,5$; n = 115).

Colonias en PDA inicialmente pálidas, que con la edad se van oscureciendo gradualmente y, en último término, viran del gris al gris oscuro. Una característica distintiva es la producción de un pigmento amarillo que difunde por el medio más allá del límite de crecimiento de la colonia. El color más intenso se alcanza tras 3 d a 25° C, posteriormente, se vuelve violáceo y pasados 6-7 d, el color amarillo deja de apreciarse. Finalmente, el color violáceo se oscurece y queda enmascarado por el denso crecimiento del micelio. Pigmento amarillo también formado en otros medios de cultivo pero suele ser menos intenso que en PDA. En OA, conidioma unilocular, con producción de conidios tras 5-7 d a 23° C. Conidios hialinos, de pared delgada, aseptados, de fusiformes a elíptico-fusiformes, con un vértice subobtusado y una base truncada o redondeada normalmente con una pequeña parte de la célula conidiógena enganchada, de (15–) 18–22,5 (–24) \times 4,5–6 (–7,5) μm , (media \pm DS = $19,7 \pm 1,8 \times 5,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$; n = 242) y ratio L/A de (2.4–)3.4–3.9(–5.3), (media \pm DS = $3,6 \pm 0,5$; n = 242). Microconidios formados por algunos aislados, de alargados a reniformes y de extremos truncados o redondeados, de 3-5 \times 1-2 μm .

Neofusicoccum parvum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Stud. Mycol. 55: 248. 2006.

Basónimo: *Fusicoccum parvum* Pennycook & Samuels, Mycotaxon 24: 455. 1985.

Teleomorfo: "***Botryosphaeria***" *parva* Pennycook & Samuels, Mycotaxon 24: 455. 1985.

Las descripciones del teleomorfo y anamorfo corresponden a las notas incluidas en Phillips, Phytopathologia Mediterranea 41: 9. 2002.

Ascoma morfológicamente indiferenciable del de *B. dothidea*, inicialmente inmerso, aislado o en grupos, en complejos estromáticos multiloculares, emergiendo hacia la epidermis por un ostíolo bien desarrollado. Lóculos individuales de 180-250 μm de diam, pared *textura angularis* gruesa y oscura, tornándose más pálida y delgada hacia el interior, contenido blanco cuando está seco y abriéndose a través de un ostíolo perifisado. Ascas similares a las de *B. dothidea*, de 75–145 \times 17–20 μm , bitunicadas, claviformes, estipitadas, con 8 esporas por asca, irregularmente biseriadas. Ascóporas generalmente de elipsoides a fusiformes, más anchas desde la mitad al tercio superior, de (15–) 18–27 (–29,5) \times (6–) 8–11 μm , hialinas, lisas, de pared delgada, biseriadas. Pseudoparáfisis hialinas, septadas, ramificadas, de 2-3,5 μm de ancho.

Conidioma externamente indiferenciable del ascoma, uni- o multilocular, aislado o formado en el mismo estroma que el ascoma, globoso a piriforme y con una papila pequeña, y ostiolo no perifisado. Conidióforos hialinos, lisos, de pared delgada, raramente ramificados en la base, cilíndricos, formados por células de la pared interna del lóculo, de 8–19 X 3–4 μm . Células conidiógenas discretas, integradas, hialinas, lisas, cilíndricas, formando un primer conidio holoblástico y los siguientes enteroblásticos, proliferando de forma percurrente con 2-3 proliferaciones no claras, o bien, determinadas, con fiálides típicas y engrosamientos periclinales (*sensu* Sutton 1980, *The Coelomycetes*). Conidios elípticos con vértices subobtusos y base truncada, lisos, de pared delgada, hialinos, unicelulares, de (13,5–) 15–22,5 (–28,5) X 4–7,5 μm (media \pm DS = 18,9 X 5,5 μm ; n = 300) y ratio L/A de 2,4–4,5 (media = 3,5).

Conidioma en OA multilocular, no papilado. Producción de conidios tras 13-15 d de incubación a 23° C. Conidios, en cultivo, hialinos, gutulados, de pared delgada, no septados, lisos, de fusiformes a elípticos, con un apéndice subobtuso y con la base truncada o redondeada, a menudo con un pequeño fragmento de la célula conidiógena adosado. Conidios más anchos hacia la mitad o en el tercio superior, de (12–) 15–20 (–24) X (4–) 4,5–6 (–7,5) μm , (media \pm DS = 17,2 \pm 1,6 X 5,6 \pm 0,6 μm ; n = 320) y ratio L/A de (1,8–) 2,5–4 (–5), (media \pm DS = 3,2 \pm 0,4; n = 320). Conidios maduros volviéndose oliváceos o marrón claro con la edad y, en ocasiones, desarrollando un septo antes de germinar. Microconidios presentes en algunos aislados, hialinos, lisos, alargados y truncados en los extremos, de 3–5 X 1–1,5 μm .

Neofusicoccum vitifusiforme (Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Stud. Mycol.* 55: 248. 2006.

Basionimo: *Fusicoccum vitifusiforme* Niekerk & Crous, *Mycologia* 96: 793. 2004.

Teleomorfo: desconocido.

Picnidios solitarios, estromáticos, de globosos a obpiriformes, de más de 450 μm de diam, con pared de 6-15 células de grosor, *textura angularis*, de color marrón que se vuelve hialina hacia la región interna. Conidióforos de 0-1 septo, hialinos, subcilíndricos, de 10–45 X 2,5–5 μm . Células conidiógenas holoblásticas, hialinas, subcilíndricas, de 10–30 X 2,5–3,5 μm , con proliferación percurrente de numerosas proliferaciones o proliferación al mismo nivel con diminutos engrosamientos periclinales. Conidios hialinos, granulares, de fusiformes a elípticos, más anchos en el tercio superior, con un vértice obtuso y aplastado, base truncada. Dimensiones *in vitro* de (18–) 19–21 (–22) X (4,5–) 5,5–6,5 (–8) μm y ratio L/A de 3,3.

Colonias en PDA de márgenes planos y lisos, blanca en superficie y verdosa-olivácea en la parte inferior, llegando a los 31 mm de radio tras 3 d a 25° C. Rango de temperaturas para su crecimiento: mínimo 10° C, máximo 35° C, óptimo 30° C.

ANEXO 2

Tabla de las especies citadas en los diferentes capítulos

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico	Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad	Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>australis</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>	JL622	Constantí, Tarragona	-	-	+	+	+	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	CMW6837	Australia	-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	CMW15951	Australia	-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	CMW15954	Australia	-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	UCD1314So	California, EE.UU.	-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	STE-U 4418	Sudáfrica	-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	UCD1314So	California, EE.UU.	-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	VPRI 40503	Australia	-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>corticola</i>	<i>Diplodia corticola</i>	JL240	Jerez de los Caballeros, Badajoz	-	-	-	-	+	-
" <i>B.</i> " <i>corticola</i>	<i>Di. corticola</i>	CBS112547	Montoro, Córdoba	-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>corticola</i>	<i>Di. corticola</i>	CBS112549	Aveiro, Portugal	-	-	+	-	-	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Fusicoccum aesculi</i>	JL353 (CBS121484)	Caldes de Montbui, Barcelona	+	+	+	+	-	1, 2, 3
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	JL380	Montemor-o-Novo, Portugal	+	+	+	-	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	JL607	Vilamanisclé, Gerona	-	-	-	-	+	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 2-2	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 8-4	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 10-2	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 12-3	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP022	Portugal	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP025	Portugal	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP067	Portugal	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP071	Portugal	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CBS118831	Sudáfrica	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CMW8000	Suiza	-	-	+	-	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CMW9075	Nueva Zelanda	-	-	+	-	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.03	Columbia, EE.UU.	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.09	Columbia, EE.UU.	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.23	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.42	Desconocido	-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.54	Nueva Zelanda	-	-	-	+	-	-

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico		Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad		Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PI497	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PI565	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PIL22	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	RR79	España		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	SAS17	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	UCD303Spa	España		-	-	-	+	-	-
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	V53.2	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>iberica</i>	<i>Diplodia iberica</i>	JL209	Monzón, Huesca		-	-	-	-	+	-
" <i>B.</i> " <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	JL599	Constantí, Tarragona		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	CBS115035	Monzón, Huesca		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	CBS121001	California, EE.UU.		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	CBS121002	California, EE.UU.		-	-	+	-	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>lutea</i>	<i>Neofusicoccum luteum</i>	JL381	Sintra, Portugal		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	JL519	Gandesa, Tarragona		-	-	+	+	+	1, 2, 3
		(CBS121482)								
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 3088	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4393	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4403	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4592	Portugal		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	UCD2090Te	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>obtusa</i>	<i>Diplodia seriata</i>	JL351	Caldes de Montbui, Barcelona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL379	La Bisbal del Penedès, Tarragona		-	-	+	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL395	L'Arboç del Penedès, Tarragona		-	-	-	-	+	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL398	Pacs del Penedès, Barcelona		+	+	+	+	+	1, 2, 3
		(CBS121485)								
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL414	La Granada, Barcelona		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL421	Capçanes, Tarragona		+	+	+	-	-	1
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL426	La Vilella Baixa, Tarragona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL471	Vilalba dels Arcs, Tarragona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	JL482	Gandesa, Tarragona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	CBS119049	Italia		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	CMW7774	Nueva York, EE.UU.		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	CMW8232	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	I-29	La Granada, Barcelona		-	-	-	-	-	1
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	I-50	Masquefa, Barcelona		-	-	-	-	-	1
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	STE-U 4440	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	STE-U 4587	Francia		-	-	-	+	-	-

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico		Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad		Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
" <i>B.</i> obtusa	<i>Di. seriata</i>	STE-U 5034	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> obtusa	<i>Di. seriata</i>	Thv1-5	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> obtusa	<i>Di. seriata</i>	UCD666Na	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> obtusa	<i>Di. seriata</i>	WAC11342	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> obtusa	<i>Di. seriata</i>	5-17-31E X2	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	JL347	Cabrils, Barcelona		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL352	Caldes de Montbui, Barcelona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL382	Palmela, Portugal		+	+	+	-	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL387	La Bisbal del Penedès, Tarragona		-	-	-	-	-	1
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL396 (CBS121486)	L'Arboç del Penedès, Tarragona		-	-	+	-	+	1, 2, 3
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL434	Sant Llorenç d'Hortons, Barcelona		-	-	-	-	-	1
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL444	Piera, Barcelona		-	-	-	-	-	1
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL499	Vilafranca del Penedès, Barcelona		-	-	-	-	+	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL504 (FG24C)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	JL505 (FG47V)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	ATCC58189	Nueva Zelanda		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	CMW6967	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	CMW9077	Nueva Zelanda		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	CMW9952	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	CMW14029	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	CMW15950	Australia		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	I	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	UCD642So	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> parva	<i>N. parvum</i>	96-29	Nueva Zelanda		-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	JL580	Reus, Tarragona		-	-	+	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	JL664	Fontaneres, Valencia		-	-	+	+	+	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	CM25	Brasil		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	CM55	Brasil		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	CMW10130	Uganda		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	GL3-8B	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	UCD1814Md	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	UCD202Co	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	WAC10711	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	WAC11080	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	ZS96-112	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> rhodina	<i>L. theobromae</i>	ZS96-172	Sri Lanka		-	-	-	+	-	-

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico		Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad		Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>sarmentorum</i>	<i>Diplodia sarmentorum</i>	CBS115038	Holanda		-	-	-	-	+	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	JL368	Montemor-o-Novo, Portugal		+	+	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	JL589	Lapuebla de Labarca, Álava		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CBS431	Países Bajos		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CBS112553	Portugal		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CBS112554	Portugal		-	-	+	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CMW7781	Desconocido		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	F99-1	Vaucluse, Francia		-	-	+	-	+	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	KJ 93.35	España		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	UCD1965SB	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	WAC11082	Australia		-	-	-	+	-	-
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>viticola</i>	<i>Dothiorella viticola</i>	JL412 (CBS117006)	Vimbodí, Tarragona		+	+	+	+	-	1, 2
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL527	Sant Sadurn de Anoia, Barcelona		+	+	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL570	Bot, Tarragona		+	-	-	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL571 (CBS117009)	Vimbodí, Tarragona		-	-	+	+	+	-
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL659 (CBS121000)	California, EE.UU.		-	-	+	-	-	-
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL660 (CBS120999)	California, EE.UU.		-	-	+	-	-	-
-	<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	CBS112878	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
-	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	JL563 (CBS121481)	Gandesa, Tarragona		+	+	+	+	+	1, 2
-	<i>N. vitifusiforme</i>	CBS110887	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
<i>Cryptospora</i> <i>viticola</i>	<i>Phomopsis viticola</i>	JL627	Peralada, Gerona		-	-	-	-	+	-
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	-	JL424 (CBS117485)	Capçanes, Tarragona		-	-	-	+	+	-
<i>Eutypa lata</i>	<i>Libertilla blepharis</i>	JL399	Pacs del Penedès, Barcelona		-	-	-	-	+	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	CBS 289.87	Francia		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	D-Ap-100	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	E43M	España		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	PA2	EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	PA4	EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE7	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE30	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico		Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad		Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE456	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	wb457	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	-	JL528	El Montmell, Tarragona		-	-	-	-	+	-
<i>F. mediterranea</i>	-	EK1	Grecia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	EK2	Grecia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-Ag	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FMCE	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-G5	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-LgtA.P.	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-TdQ1	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	FPV2	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	GP1	Eslovenia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	HR3.1	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	JM1	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	LM1	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	LR79	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	PC1	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	TW7.98a	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	TW7.98b	Italia		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	45/23.3	Alemania		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	97.A4	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	216.03	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	217.03	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	235.03	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	238.03	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	243.03	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>F. mediterranea</i>	-	940417.3	Desconocido		-	-	-	+	-	-
<i>Hypocreales</i> sp.	-	CMW7063	Desconocido		-	-	+	-	-	-
<i>Nectria</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	JL377	Vilafranca del Penedès, Barcelona		-	-	-	-	+	-
<i>Rosellinia necatrix</i>	<i>Dermatophora necatrix</i>	JL425	L'Arboç del Penedès, Tarragona		-	-	-	-	+	-
<i>Stereum hirsutum</i>	-	JL533	Albinyana, Tarragona		-	-	-	-	+	-
<i>Togninia minima</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	JL392	La Bisbal del Penedès, Tarragona		-	-	-	-	+	-
<i>T. minima</i>	<i>Pm. aleophilum</i>	JL397	L'Arboç del Penedès, Tarragona		-	-	-	+	-	-
<i>T. minima</i>	<i>Pm. aleophilum</i>	CBS246.91	Yugoslavia		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. angustus</i>	RR418 (CBS114992)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. angustus</i>	CBS 249.95	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº colección) ^a	Origen geográfico		Estudio morfológico		Estudio molecular y filogenético	Sonda de hibridación		Pruebas de patogenicidad ^b
			Localidad		Estr. reproductoras	Colonias		Diseño	Testado	
-	<i>Pm. inflatipes</i>	RR408 (CBS166.75)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. viticola</i>	RR415 (CBS13065)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. viticola</i>	CBS101738	Francia		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. mortoniae</i>	RR414 (CBS211.97)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. scolity</i>	RR411 (CBS113593)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. venezuelense</i>	RR410 (CBS651.85)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. krajdinii</i>	RR409 (CBS109479)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pm. parasiticum</i>	RR370 (CBS860.73)	Desconocido		-	-	-	+	-	-
-	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	JL391	La Bisbal del Penedès, Tarragona		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	JL405	Castellví de la Marca, Barcelona		-	-	-	+	+	-
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	JL437	Capçanes, Tarragona		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	CBS 161.90	Sudáfrica		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	CBS 229.95	Italia		-	-	-	+	-	-
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	CBS239.74	California, EE.UU.		-	-	-	+	-	-

^a Principales colecciones:

CAP (Alan Phillips, Univ. Nova de Lisboa, Portugal). CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Países Bajos). CMW (Michael J. Wingfield, Universidad de Pretoria, Sudáfrica). JL (Jordi Luque, IRTA Cabrils, Barcelona). RR (Rosa Raposo, INIA, Madrid). UCD (Universidad de California Davis).

El resto de aislados proceden de colecciones no conocidas cuyos datos se han extraído de GenBank.

^b Pruebas de patogenicidad:

1: aislados correspondientes al capítulo 4. 2: aislados correspondientes al capítulo 5. 3: aislados correspondientes al capítulo 6.

ANEXO 3

Tabla de los códigos de referencia de GenBank para las especies empleadas en el capítulo 2

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº de colección) ^a	ITS	EF1- α	β -tubulina
<i>"Botryosphaeria" australis</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>	CMW6837	AY339262	AY339270	AY339254
"B." <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	CMW15951	DQ093201	DQ093225	DQ093212
"B." <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	CMW15954	DQ093200	DQ093222	DQ093209
"B." <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	STE-U 4418	AY343387		
"B." <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	UCD1314So	DQ008323		
"B." <i>australis</i>	<i>N. australe</i>	VPRI 40503	EF173908		
<i>"Botryosphaeria" corticola</i>	<i>Diplodia corticola</i>	CBS112547	AY259110	DQ458872	DQ458854
"B." <i>corticola</i>	<i>Di. corticola</i>	CBS112549	AY259100	AY573227	DQ458853
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Fusicoccum aesculi</i>	BOT 10-2	AF196296		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 12-3	AF196298		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 2-2	AF196299		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	BOT 8-4	AF196294		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP022	AF286259		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP025	AF286260		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP067	AF286268		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CAP071	AF286269		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CBS118831	DQ316084		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CMW8000	AY236949	AY236898	AY236927
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	CMW9075	AY236950	AY236899	AY236928
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.03	AF027742		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.09	AF027752		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.23	AF027751		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.42	AF027741		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	KJ 93.54	AF027750		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PI497	AF452704		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PI565	AF452705		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	PIL22	AF464948		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	SAS17	AF464951		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	UCD303Spa	DQ356353		
<i>B. dothidea</i>	<i>F. aesculi</i>	V53.2	AY662403		
<i>"Botryosphaeria" iberica</i>	<i>Diplodia iberica</i>	JL209 (CBS115035)	AY 573213	AY 573228	
"B." <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	CBS121001	EF202008	EF202022	EF202015
"B." <i>iberica</i>	<i>Di. iberica</i>	CBS121002	EF202009	EF202023	EF202016
<i>"Botryosphaeria" lutea</i>	<i>Neofusicoccum luteum</i>	STE-U 3088	AF452555		
"B." <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4393	AF452548		
"B." <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4403	AF452553		
"B." <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	STE-U 4592	AY343416		
"B." <i>lutea</i>	<i>N. luteum</i>	UCD2090Te	DQ233606		
<i>"Botryosphaeria" obtusa</i>	<i>Diplodia seriata</i>	CBS119049	DQ458889	DQ458874	DQ458857
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	CMW7774	AY236953	AY236902	AY236931
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	CMW8232	AY972105		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	STE-U 4440	AY343420		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	STE-U 4587	AY343441		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	STE-U 5034	AY343445		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	Thv1-5	AY662396		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	UCD645So	DQ008319		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	UCD666Na	DQ008320		
"B." <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	WAC11342	AY727839		

Anexo 3 Secuencias ITS de GenBank

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº de colección) ^a	ITS	EF1- α	β -tubulina
" <i>B.</i> " <i>obtusa</i>	<i>Di. seriata</i>	5-17-31E X2	AY662401		
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	ATCC58189	AF243395	AY573221	
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	CMW6967	AY194473		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	CMW9077	AY236939	AY236884	AY236913
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	CMW9952	AY194471		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	CMW14029	DQ316078		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	CMW15950	DQ093193	DQ093202	DQ093213
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	I	DQ499154		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	STE-U 4589	AY343472		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	UCD642So	DQ008328		
" <i>B.</i> " <i>parva</i>	<i>N. parvum</i>	96-29	AF243395		
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM25	AY745998		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	CM55	AY754002		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	CMW10130	AY236951	AY236900	AY236929
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	GL3-8B	AY662402		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	UCD1814Md	DQ233596		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	UCD202Co	DQ008309		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	WAC10711	AY727852		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	WAC11080	AY727846		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	96-112	AF243401		
" <i>B.</i> " <i>rhodina</i>	<i>L. theobromae</i>	96-172	AF243400		
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	CBS431	AY236955	AY236904	AY236933
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CBS112553	AY 259093	AY 573219	DQ458850
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CBS112554	AY259095	DQ458870	DQ458851
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	CMW7781	AY972107		
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	KJ 93.35	AF027754		
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	UCD1965SB	DQ233599		
" <i>B.</i> " <i>stevensii</i>	<i>Di. mutila</i>	WAC11082	AY727838		
" <i>Botryosphaeria</i> " <i>viticola</i>	<i>Dothiorella viticola</i>	JL412 (CBS117006)	AY905555	AY905562	
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL571 (CBS117009)	AY905554	AY905559	
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL659 (CBS121000)	EF202013	EF202024	EF202017
" <i>B.</i> " <i>viticola</i>	<i>Do. viticola</i>	JL660 (CBS120999)	EF202010	EF202027	EF202020
-	<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	CBS112878	AY343381		
-	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	CBS110887	AY343383		
<i>Eutypa lata</i>	<i>Libertella blepharis</i>	CBS 289.87	DQ006928		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	D-Ap-100	AY684228		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	E43M	AJ302452		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	PA2	AY462562		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	PA4	AY462563		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE30	DQ006934		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE456	DQ006932		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	UCDE7	DQ006944		
<i>E. lata</i>	<i>L. blepharis</i>	wb457	AF455427		
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	-	EK1	AY340021		
<i>F. mediterranea</i>	-	EK2	AY340025		
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-Ag	AY780427		
<i>F. mediterranea</i>	-	FMCE	AY620997		
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-G5	AY849302		
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-LgtA.P.	AY849304		
<i>F. mediterranea</i>	-	FM-TdQ1	AY780426		
<i>F. mediterranea</i>	-	FPV2	AY529694		
<i>F. mediterranea</i>	-	GP1	AY340033		
<i>F. mediterranea</i>	-	HR3.1	AY529698		
<i>F. mediterranea</i>	-	JM1	AY529696		
<i>F. mediterranea</i>	-	LM1	AY340023		
<i>F. mediterranea</i>	-	LR79	AY529697		

Teleomorfo	Anamorfo	Aislado (nº de colección) ^a	ITS	EF1- α	β -tubulina
<i>F. mediterranea</i>	-	PC1	AY529695		
<i>F. mediterranea</i>	-	TW7.98a	AY340029		
<i>F. mediterranea</i>	-	TW7.98b	AY340030		
<i>F. mediterranea</i>	-	216.03	AY529690		
<i>F. mediterranea</i>	-	217.03	AY529684		
<i>F. mediterranea</i>	-	235.03	AY529683		
<i>F. mediterranea</i>	-	238.03	AY529691		
<i>F. mediterranea</i>	-	243.03	AY529689		
<i>F. mediterranea</i>	-	45/23.3	AY340034		
<i>F. mediterranea</i>	-	940417.3	AY340027		
<i>F. mediterranea</i>	-	97.A4	AY529693		
<i>Hypocreales</i> sp.	-	CMW7063	AY236956	AY236905	AY236934
<i>Togninia minima</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS246.91	AY179934	AY179900	AF192390
-	<i>Phaeoacremonium angustius</i>	CBS 249.95	AY772240	AF197974	AF246814
-	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	RR370 (CBS860.73)	DQ173144		
-	<i>Phaeoacremonium viticola</i>	CBS101738	AF118137		
-	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	CBS229.95	AF266656		
-	<i>Pa. chlamydospora</i>	CBS239.74	AF266653		

^a Principales colecciones:

CAP (Alan Phillips, Univ. Nova de Lisboa, Portugal). CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Países Bajos). CMW (Michael J. Wingfield, Universidad de Pretoria, Sudáfrica). JL (Jordi Luque, IRTA Cabrils, Barcelona). RR (Rosa Raposo, INIA, Madrid). UCD (Universidad de California Davis).

El resto de aislados proceden de colecciones no conocidas cuyos datos se han extraído de GenBank.

Descripción original de *Dothiorella viticola* en *Mycologia* 97 (5), 2005, pp. 1111-1121.

Mycologia, 97(5), 2005, pp. 1111–1121.

© 2005 by The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897

***Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph**

Jordi Luque
Soledad Martos

Departament de Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Centre de Cabriels, Ctra. de Cabriels s.n., E-08348 Cabriels, Barcelona, Spain

Alan J.L. Phillips¹

Centro de Recursos Microbiológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

Abstract: *Botryosphaeria viticola* sp. nov., isolated from pruned canes of *Vitis vinifera* in NE Spain, is described and illustrated. Phylogenetic analysis based on ITS and EF1- α sequences and morphological characters of both anamorph and teleomorph confirmed this taxon to be included within the group of *Botryosphaeria* species with *Dothiorella* anamorphs. It is related most closely to *B. sarmentorum* and *B. iberica* from which it differs in morphological characters of the teleomorph and DNA sequences.

Key words: Botryosphaeriaceae, *Diplodia*, *Fusicoccum*, ITS, molecular phylogenetics, translation elongation factor EF1- α

INTRODUCTION

Species of *Botryosphaeria* Ces. & De Not. are well known as pathogens, saprophytes and endophytes on a wide range of woody angiosperm and gymnosperm hosts (Barr 1972, von Arx 1987, Denman et al 2000). While the morphology of the teleomorphic states differs little among species, a wide range of morphologies is seen in the anamorphs and it is on this basis that species are distinguished. Anamorphs of *Botryosphaeria* species currently are placed in the genera *Fusicoccum* Corda, *Diplodia* Fr., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., and *Dothiorella* Sacc. (Crous and Palm 1999, Denman et al 2000, Phillips et al 2005). These four genera clearly are separated on their morphology and their phylogenetic relationships shown by the analysis of sequence data of the internal transcribed spacer (ITS) of the rRNA repeat (Phillips et al 2005). Additional gene sequences, such as partial sequences of the β -tubulin gene and the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α), also have been used to

unambiguously differentiate species within *Botryosphaeria* (Slippers et al 2004, van Niekerk et al 2004).

The genus *Dothiorella* was resurrected to accommodate anamorphs of *Botryosphaeria* species with conidia that become colored and septate at an early stage of development, even before they are released from the conidiogenous cell (Phillips et al 2005). This contrasts with conidia of *Diplodia* species, which are hyaline and become dark and septate only some time after they are formed, normally after a period of aging once they are discharged from the pycnidia (Shoemaker 1964, Alves et al 2004, Phillips et al 2005). Another distinctive morphological feature of *Botryosphaeria* species with *Dothiorella* anamorphs is their brown, one-septate ascospores. Although ascospores of most *Botryosphaeria* species occasionally are known to become pale brown and one-septate with age (Shoemaker 1964, Sivanesan 1984, Alves et al 2004) others, such as *B. laricis* (Wehm.) von Arx & Müller and *B. visci* (Kalchbr.) von Arx & Müller, are reported to be dark brown (Sivanesan 1984). Ascospores of the species so far reported with *Dothiorella* anamorphs become intensely brown at an early stage of development (Phillips et al 2005).

During a 2003–2004 survey of fungal pathogens associated with grapevine decline in Catalonia (NE Spain), a coelomycete with characters of *Dothiorella* was found frequently on discarded pruned canes. An ascomycete with brown, one-septate ascospores was found rarely and the connection between the two states was confirmed by culture of single ascospores. Because no other fungal taxa with these characters have been described from *Vitis vinifera* L., it was thought that this fungus might represent a new species. The purpose of this study was to characterize the morphology of this fungus and to determine its phylogenetic relationship to other *Botryosphaeria* species through a study of ITS and EF1- α nucleotide sequences.

MATERIALS AND METHODS

Isolates and morphology.—Isolations were made from single conidia, single ascospores or by directly plating out pieces of diseased tissue after surface sterilization in 70% ethanol for 4 min. Isolates were cultured on Difco potato-dextrose agar (PDA) at 25 C. Sporulation was enhanced by culturing the isolates on 2% water agar bearing pieces of autoclaved grapevine canes at 25 C with a 12/12 h photoperiod. Growth rates were de-

Accepted for publication 9 July 2005.

¹Corresponding author. E-mail: alp@mail.fct.unl.pt

1112

MYCOLOGIA

TABLE I. Isolates included in this study

Culture ¹	Species	Host	Collector	Locality	GenBank ²	
					ITS	EF1- α
CBS 117009	<i>Botryosphaeria viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. Garnatxa Negra	J. Luque & S. Martos	Spain, Vimbodí	AY905554	AY905559
CBS 117006	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Garnatxa Negra	J. Luque & R. Mateu	Spain, Vimbodí	AY905555	AY905562
CBS 117007	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Macabeu	J. Luque & S. Martos	Spain, Gandesa	AY905556	
CBS 117008	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Xarel·lo	J. Luque & J. Reyes	Spain, Sant Sadurní d'Anoia	AY905557	AY905560
CBS 117010	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Macabeu	J. Luque & S. Martos	Spain, Sant Esteve Sesroviures	AY905558	AY905561
JL570	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Ull de llebre	J. Luque & S. Martos	Spain, Bot		
JL572	<i>B. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Garnatxa Negra	J. Luque & S. Martos	Spain, Vimbodí		
CBS 112869	<i>Diplodia</i> sp.	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa, Western Cape	AY343373	AY343336
CBS 112870	<i>Diplodia</i> sp.	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa, Western Cape	AY343376	AY343337
CBS 112872	<i>B. australis</i>	<i>V. vinifera</i>	F. Halleen	South Africa	AY343388	AY343347
CBS 112877	<i>B. australis</i>	<i>V. vinifera</i>	F. Halleen	South Africa	AY343385	AY343346
CBS 112549	<i>B. corticola</i>	<i>Quercus suber</i>	A. Alves	Portugal, Aveiro	AY259100	AY573227
CBS 112545	<i>B. corticola</i>	<i>Q. suber</i>	M.E. Sánchez & A. Trapero	Spain, Cádiz	AY259089	AY573226
CMW 8000	<i>B. dothidea</i>	<i>Prunus</i> sp.	B. Slippers	Switzerland, Crocifisso	AY236949	AY236898
CBS 116741	<i>B. dothidea</i>	<i>Olea europea</i>	I. Rumbos	Greece, Thessalia	AY640254	AY640257
CBS 110300	<i>B. dothidea</i>	<i>Populus nigra</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Braga	AY640253	AY640256
CBS 110302	<i>B. dothidea</i>	<i>V. vinifera</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Montemor-o-Novo	AY259092	AY573218
CBS 115041	<i>B. iberica</i>	<i>Quercus ilex</i>	J. Luque	Spain, Aragon	AY573202	AY573222
CBS 115035	<i>B. iberica</i>	<i>Q. ilex</i>	N. Ibarra	Spain, Aragon	AY573213	AY573228
CBS 115040	<i>B. iberica</i>	<i>Q. ilex</i>	J. Luque	Spain, Catalonia	AY573214	AY573232
CBS 110299	<i>B. lutea</i>	<i>V. vinifera</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Oeiras	AY259091	AY573217
CMW 9076	<i>B. lutea</i>	<i>Malus x domestica</i>	S.R. Pennycook	New Zealand	AY236946	AY236893
CBS 112555	<i>B. obtusa</i>	<i>V. vinifera</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Montemor-o-Novo	AY259094	AY573220
CMW 7775	<i>B. obtusa</i>	<i>Ribes</i> sp.	B. Slippers & G. Hudler	USA, New York	AY236954	AY236903
CMW 9081	<i>B. parva</i>	<i>P. nigra</i>	G.J. Samuels	New Zealand, Te Puke	AY236943	AY236888
CBS 110301	<i>B. parva</i>	<i>V. vinifera</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Palmela	AY259098	AY573221
CBS 164.96	<i>B. rhodina</i>	Fruit on coral reef coast	A. Aptroot	Papua New Guinea, Madang	AY640255	AY640258
CMW 9074	<i>B. rhodina</i>	<i>Pinus</i> sp.	T. Burgess	Mexico	AY236952	AY236901
CMW 10130	<i>B. rhodina</i>	<i>Vitex donniiana</i>	J. Roux	Uganda	AY236951	AY236900
CBS 115475	<i>B. ribis</i>	<i>Ribes</i> sp.	G. Hudler	USA, New York	AY236935	AY236877
CMW 7773	<i>B. ribis</i>	<i>Ribes</i> sp.	G. Hudler	USA, New York	AY236936	AY236878
IMI 63581b	<i>B. sarmentorum</i>	<i>Ulmus</i> sp.	E.A. Ellis	England, Warwickshire	AY573212	AY573235

TABLE I. Continued

Culture ¹	Species	Host	Collector	Locality	GenBank ²	
					ITS	EF1- α
CBS 115038	<i>B. sarmentorum</i>	<i>Malus pumila</i>	A.J.L. Phillips	Netherlands, Delft	<i>AY573206</i>	<i>AY573223</i>
CBS 120.41	<i>B. sarmentorum</i>	<i>Pyrus communis</i>	H.W. Wollenweber	Norway	<i>AY573207</i>	<i>AY573224</i>
CBS 112553	<i>B. stevensii</i>	<i>V. vinifera</i>	A.J.L. Phillips	Portugal, Montemor-o-Novo	<i>AY259093</i>	<i>AY573219</i>
CBS 431.82	<i>B. stevensii</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	H.A. van der Aa	Netherlands, Maarseveen	<i>AY236955</i>	<i>AY236904</i>
CBS 110496	<i>Diplodia porosum</i>	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa, Stellenbosch	<i>AY343379</i>	<i>AY343340</i>
CBS 110574	<i>D. porosum</i>	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa	<i>AY343378</i>	<i>AY343339</i>
CBS 112878	<i>Fusicoccum viticlavatum</i>	<i>V. vinifera</i>	F. Halleen	South Africa, Stellenbosch	<i>AY343380</i>	<i>AY343342</i>
CBS 112977	<i>F. viticlavatum</i>	<i>V. vinifera</i>	F. Halleen	South Africa	<i>AY343381</i>	<i>AY343341</i>
CBS 110887	<i>F. vitifusiforme</i>	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa, Stellenbosch	<i>AY343383</i>	<i>AY343343</i>
CBS 110880	<i>F. vitifusiforme</i>	<i>V. vinifera</i>	J.M. van Niekerk	South Africa	<i>AY343382</i>	<i>AY343344</i>
CBS 119.25	<i>Cercospora apii</i>	<i>Apium graveolens</i>	L.J. Klotz	Unknown	<i>AY179949</i>	<i>AY179915</i>
CMW7063	Hypocreales sp.	Unknown	Unknown	Unknown	<i>AY236956</i>	<i>AY236905</i>

¹Acronyms of culture collections: CBS—Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CMW—M.J. Wingfield, FABI, University of Pretoria, South Africa; IMI—CABI Bioscience, Egham, UK; JL—J. Luque, IRTA, Barcelona, Spain; STE-U—Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa. Isolate accession numbers in bold signify cultures ex-type, or from samples that have been linked morphologically to the type material.

²Sequence numbers in italics were retrieved from the GenBank public database. All others were obtained in this study.

terminated on PDA plates incubated in the dark at 5–35 C in 5 C intervals. Isolates were deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherlands. Specimens were lodged with the herbarium of Estação Agronómica Nacional (LISE), Oeiras, Portugal.

Examinations were made with a Leica DMR HC microscope fitted with Nomarski DIC optics. Digital images were recorded with a Leica DFC320 digital camera, and measurements were made with the Leica IM500 measurement module. The mean, standard deviation and 95% confidence intervals were calculated from measurements of 50 conidia and ascospores. Data for spore measurements are presented as the lower and upper 95% confidence limits, with the minimum and maximum dimensions in parentheses. Dimensions of other fungal structures are given as the range of at least 20 measurements where possible.

DNA sequencing.—DNA was extracted from fungal mycelium as described by Alves et al (2004). Amplification of the ITS1 and ITS2 regions flanking the 5.8S ribosomal RNA gene was carried out with universal primers ITS1 and ITS4 (White et al 1990). Part of the translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) was amplified with primers EF1-728F and EF1-986R (Carbone and Kohn 1999). Reactions were performed on a GeneAmp[®] PCR System 9700 thermal cycler (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Each

reaction contained 0.5 μ L template DNA (about 100 ng genomic DNA), 20 μ L Eppendorf Mastermix 2.5 \times (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 0.4 μ M of each primer and made up to a final volume of 50 μ L. These temperature profiles were used: one cycle of initial denaturation at 95 C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation (20 s at 95 C), annealing (30 s at 55 C for ITS or 58 C for EF1- α) and extension (40 s at 72 C), with a final extension at 72 C for 5 min. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels and viewed under UV light after ethidium bromide staining.

PCR products were purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Purified amplicons were sequenced in both directions with the PCR primers and the BigDye[™] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California). The resulting fragments were analyzed on an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut).

Sequences were read and edited with Chromas 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). All sequences were checked manually and nucleotide arrangements at ambiguous positions were clarified with sequences from both strands. Nucleotide sequences were deposited in GenBank (TABLE I). Additional sequences for both DNA regions corresponding to other *Botryosphaeria* species were obtained from GenBank (TABLE I).

Phylogenetic analysis.—ITS and EF1- α sequences were assembled with 37 others retrieved from GenBank, representing 14 species of *Botryosphaeria* and two outgroup species (*Cercospora apii* Fresen. and a species of the Hypocreales). Hypocreales sp. was used by Slippers et al (2004) and in combination with *C. apii* (Phillips et al 2005). An extensive search of ITS and EF1- α sequences in GenBank did not reveal any suitable alternative outgroup. The sequences were aligned with Clustal X (Thompson et al 1997) and manual adjustments made where necessary. A partition homogeneity test was conducted in PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2003) to examine the possibility of a joint analysis of the two datasets. Insertions/deletions (indels) introduced by the alignment were coded by simple indel coding (Simmons and Ochoterena 2000) with the program GapCoder (Young and Healy 2003). Ambiguously aligned regions and the associated indel characters were excluded from the analyses. Neighbor joining (NJ) and maximum parsimony (MP) phylogenetic analyses were done with PAUP* (Swofford 2003). The Hasegawa-Kishino-Yano (1985) model (HKY85) was used for the NJ analysis with 1000 random sequence additions. For the MP analysis, the heuristic search option with 1000 random taxa addition and tree bisection and reconnection (TBR) as the branch-swapping options were used. All characters were unordered and of equal weight. Branches of zero length were collapsed and all multiple, equally parsimonious trees were saved. Stability of branches in the NJ and MP trees was assessed with 1000 bootstrap replications (Hillis and Bull 1993). Statistics including tree length (TL), consistency index (CI), retention index (RI), rescaled consistency index (RC) and homoplasy index (HI) were calculated with PAUP*.

RESULTS

Phylogenetic analysis.—The sequence alignment of 41 isolates (TABLE I), including the two outgroup isolates, consisted of 568 characters for the ITS region and 347 characters for the EF1- α gene, including the alignment gaps. Indels were coded separately and added to the end of the alignment as characters 916–1055. Alignment gaps were treated as missing data. Part of the ITS1 region (characters 86–140) could not be aligned unambiguously and was excluded from the analysis. Similarly, characters 608–654, close to the 5' end of the EF1- α gene also could not be aligned and were excluded. The coded indels associated with these regions (characters 929–952, 991–1001) also were excluded. Thus 918 characters were included. New ITS and EF1- α sequences were deposited in GenBank (TABLE I) and the alignments in TreeBase (S 1351). The result of the partition homogeneity test ($P=0.4800$) indicated that the

ITS and EF1- α data reflected the same underlying phylogeny, therefore the two datasets were combined in a single analysis.

The combined dataset consisted of 918 characters, of which 435 were constant and 192 variable characters were parsimony uninformative. Maximum parsimony analysis of the remaining 291 parsimony-informative characters resulted in four most parsimonious trees, one of which is shown (FIG. 1). MP trees differed only in the position of the isolates in the terminal clades, while the overall topology was the same in all trees. NJ analysis resulted in trees with the same topology as the MP trees.

Two major clades were resolved in the MP trees. One clade, with 98% bootstrap support, contained isolates with *Diplodia* and *Lasiodiplodia* anamorphs. Within this clade, five strongly supported ($\geq 99\%$ bootstrap) clades corresponding to known species could be distinguished. The other major clade (72% bootstrap) consisted of three subclades containing isolates with *Fusicoccum* and *Dothiorella* anamorphs. All *Fusicoccum* species except *B. dothidea* fell within a well supported clade (99%), and the six species that could be distinguished all received moderate to high bootstrap support (68–100%). *Botryosphaeria dothidea* isolates formed a separate clade. The *Dothiorella* species grouped in a well supported subclade (99%), further subdivided into two sister clades with 99–100% bootstrap values. All isolates from grapevines fell within a single clade, sister of *B. sarmentorum* and *B. iberica*.

Morphology.—Discarded pruned canes collected from five vineyards in NE Spain (TABLE I) bore pycnidia of a coelomycete with characters corresponding to *Dothiorella*, and one of them bore an ascomycete with bitunicate asci containing eight brown, one-septate ascospores (LISE 95177). The culture obtained from a single ascospore of this latter collection (CBS 117009) produced pycnidia and conidia that were indistinguishable from the coelomycete cited above, thus confirming the connection between the anamorph and teleomorph. Another collection (CBS 117007) was obtained from a fragment of necrotic wood.

Ascomata (FIGS. 4–6) were found rarely. Clavate asci (FIGS. 2, 8), formed among septate pseudoparaphyses (FIGS. 2, 7), contained eight, brown-walled, one-septate ascospores (FIGS. 2, 8–11). The ascospores often bore a small projection at one or both ends (FIGS. 2, 10, 11).

Conidiomata (FIG. 12) were erumpent through the host bark. Conidiogenesis (FIGS. 3, 13–17) and conidia (FIGS. 3, 18, 19) observed in pycnidia either from canes or obtained in culture were similar to

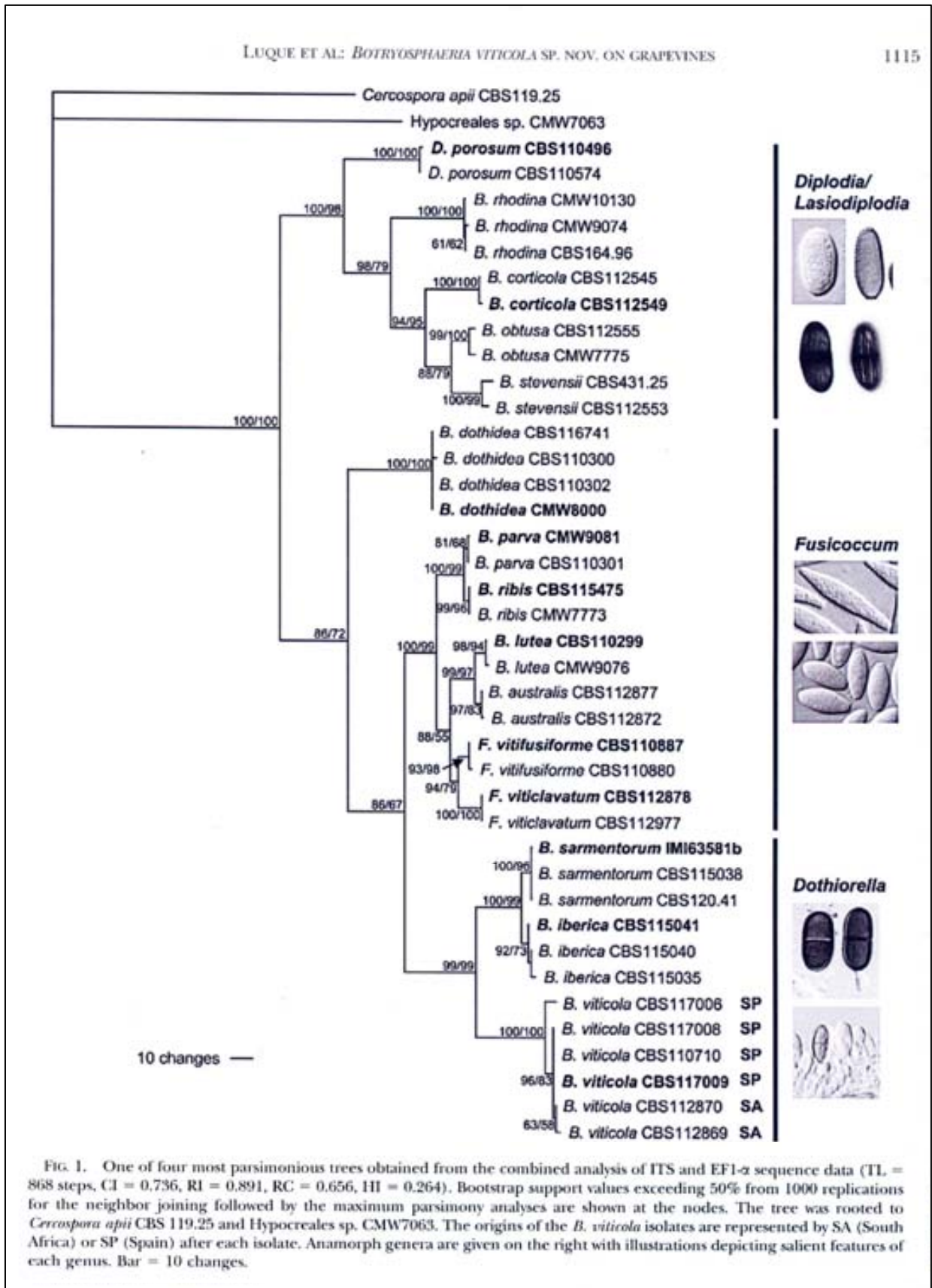
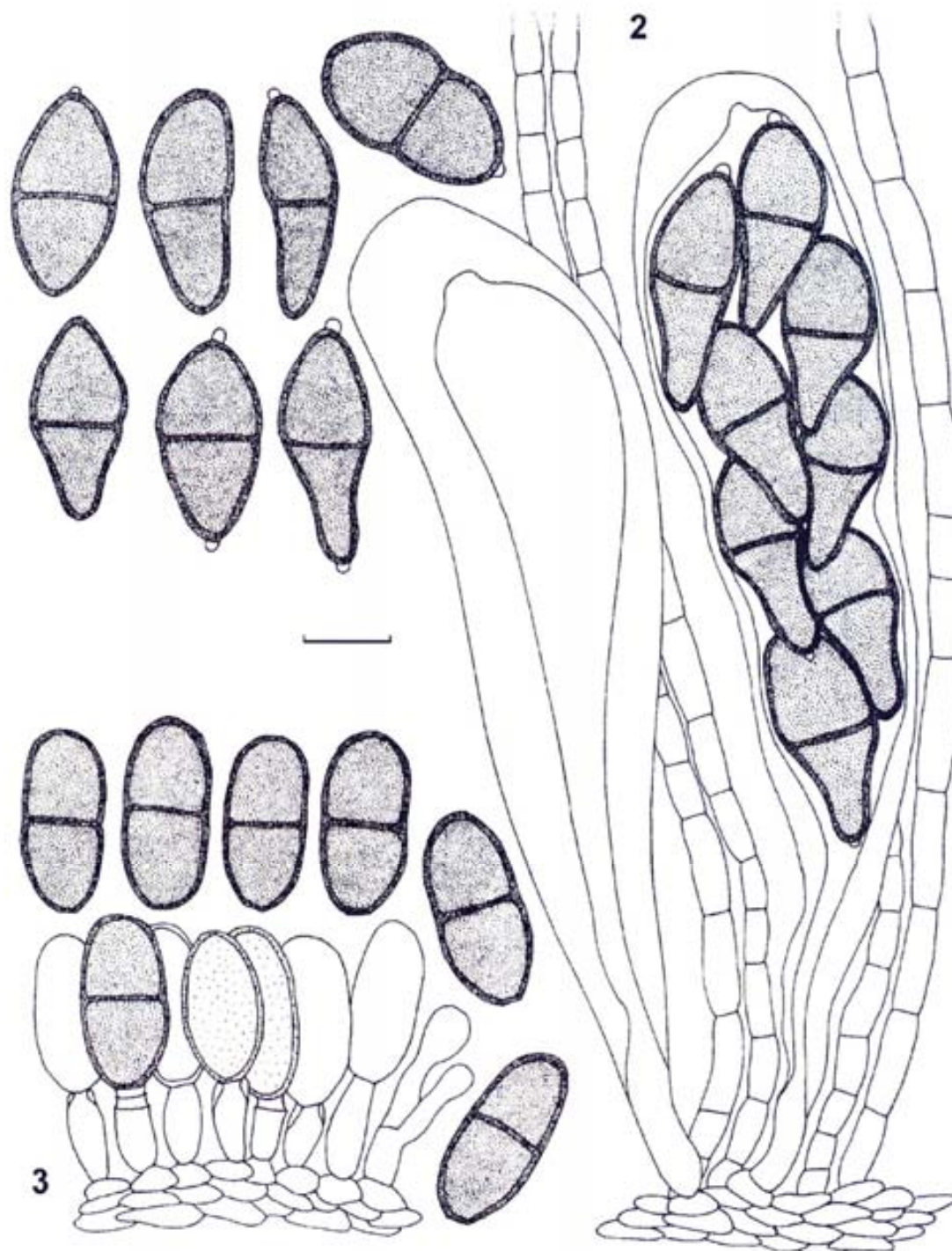


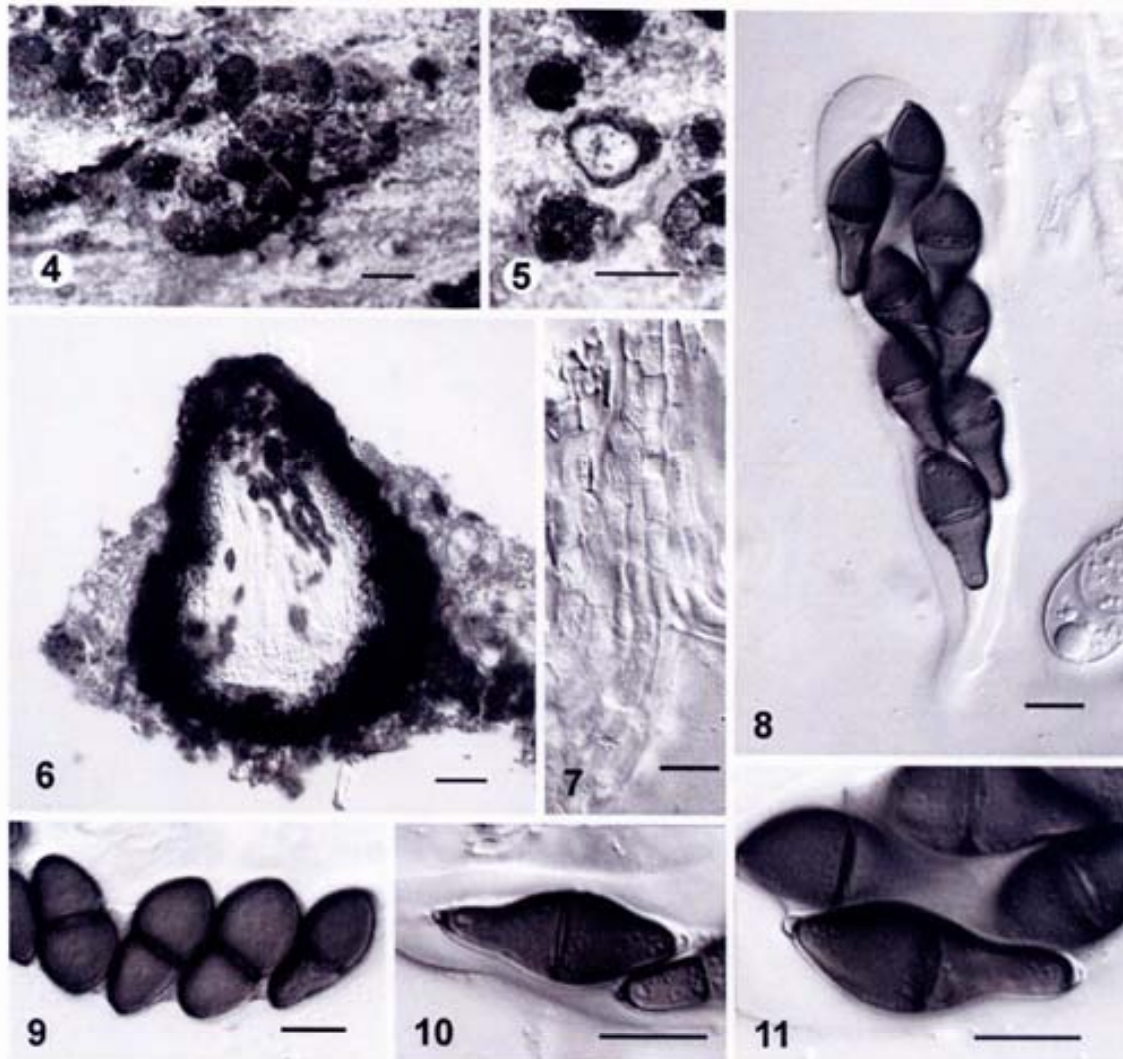
FIG. 1. One of four most parsimonious trees obtained from the combined analysis of ITS and EF1- α sequence data (TL = 868 steps, CI = 0.736, RI = 0.891, RC = 0.656, HI = 0.264). Bootstrap support values exceeding 50% from 1000 replications for the neighbor joining followed by the maximum parsimony analyses are shown at the nodes. The tree was rooted to *Cercospora apii* CBS 119.25 and *Hypocreales* sp. CMW7063. The origins of the *B. viticola* isolates are represented by SA (South Africa) or SP (Spain) after each isolate. Anamorph genera are given on the right with illustrations depicting salient features of each genus. Bar = 10 changes.

1116

MYCOLOGIA



FIGS. 2-3. *Botryosphaeria viticola* and its anamorph *Dothiorella viticola*. 2. Asci, pseudoparaphyses and ascospores of LISE 95177. 3. Conidiogenous cells and conidia of LISE 95178. Bar = 10 μ m.



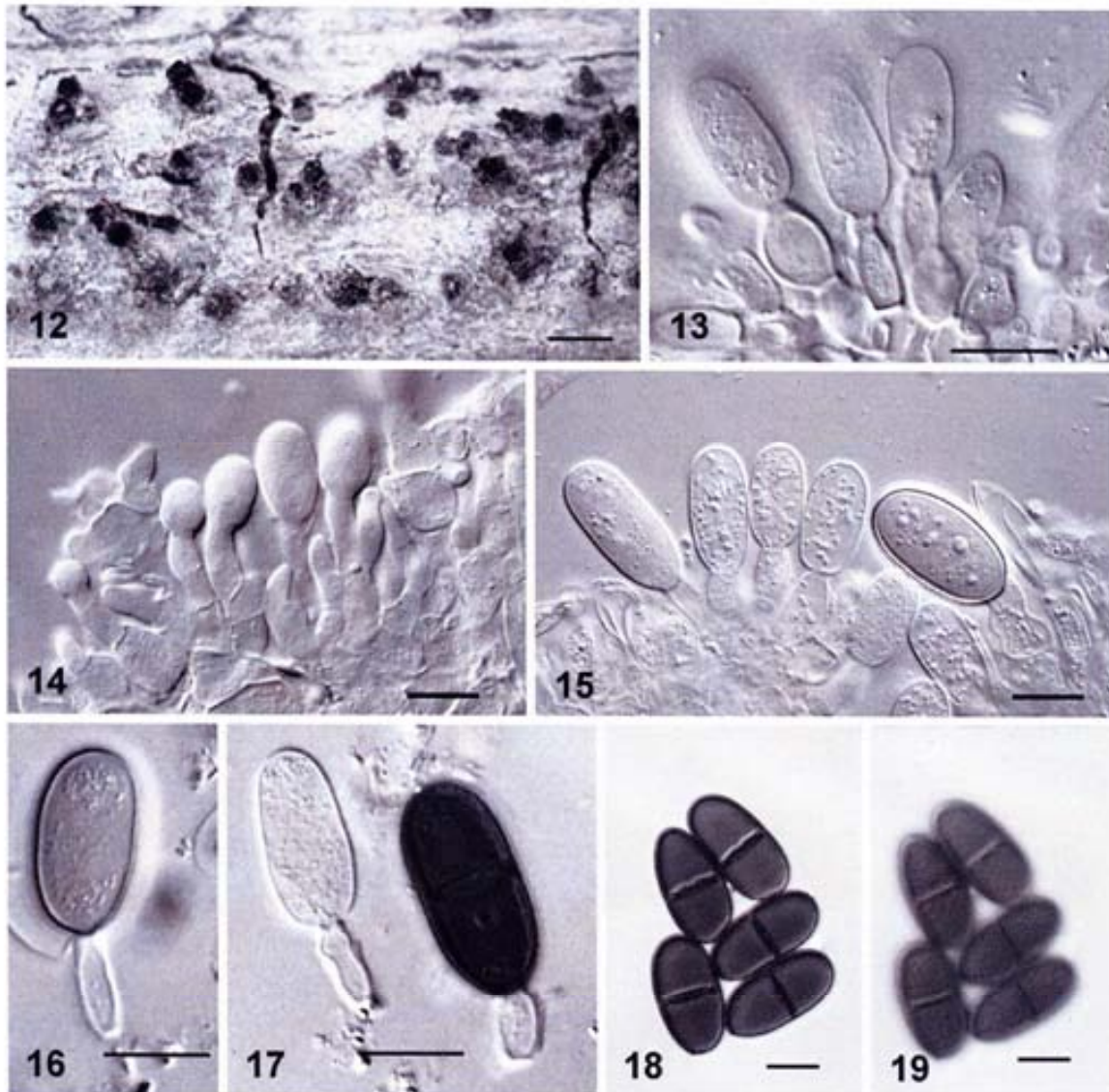
FIGS. 4–11. *Botryosphaeria viticola*. 4. Ascomata partially erumpent through the host bark. 5. Ascoma cut through horizontally showing the white contents with dark spots corresponding to asci with ascospores. 6. Vertical section through an ascoma. 7. Septate pseudoparaphyses. 8. Clavate ascus containing eight biserial, dark-brown, one-septate ascospores. 9–11. Ascospores. The ascospores in Figs. 10 and 11 bear small, rounded projections at either end. Bars: 4 = 0.5 mm, 5 = 0.25 mm, 6 = 50 μ m, 7–11 = 10 μ m.

those described for *Botryosphaeria iberica* AJL Phillips et al and *B. sarmentorum* AJL Phillips et al (Phillips et al 2005). Conidiogenesis was holoblastic (Figs. 3, 13–17), with conidiogenous cells proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings (Figs. 3, 16), or proliferating percurrently to form one or two annellations (Figs. 3, 17). Conidia were brown, thick-walled and one-septate with both ends rounded or occasionally with a truncate base (Figs. 3, 18, 19). The conidia became brown and one-septate at an early

stage, even before they were released from the conidiogenous cells (FIG. 3, 17).

TAXONOMY

Based on both phylogenetic and morphological data the fungus studied here is considered to belong to the genus *Botryosphaeria*. Because it is morphologically and phylogenetically distinct from other known species in the genus, it is described as the new species



FIGS. 12–19. *Dothiorella viticola*. 12. Conidiomata partially erumpent through the host bark. 13–17. Conidiogenous cells and conidia. 16. Conidiogenous cell with periclinal thickenings. 17. Conidiogenous cells with annellations. The cell on the right has a dark-brown, one-septate conidium attached at the tip. 18, 19. Conidia taken at two different levels of focus showing the roughening on the inner surface of the wall. Bars 12 = 0.5 mm, 13–19 = 10 μ m.

B. viticola. The teleomorph seems to be uncommon, and for this reason we think it is important to apply a name to the anamorph.

Botryosphaeria viticola A.J.L. Phillips & Luque, sp. nov. FIGS. 2–19

Anamorph. Dothiorella viticola A.J.L. Phillips & Luque, sp. nov.

Ascomata pseudothecia, plerumque solitaria, interdum aggregata, in hospitis inclusa, erumpescentia, globosa vel pyriformis, cum ostioli centrali, papillata, nigra, usque 240 μ m diam, paries pseudothecii usque 60 μ m crassis, stratis textura angularis, extus e cellulis atrobrunneis vel brunneis composita, intus e cellulis hyalinis revestimentum loculi facientibus. Asci bitunicati, clavati, 100–110 \times 25–30 μ m, stipitati, octospori, pseudoparaphysibus multis filiformibus, septatis

3.5–4.5 μm latis interspersi. Ascospores fusiformis oblongis vel subclavatis, apicibus obtusis, in fundo subacutis, (19–)22.6–23.5(–27) \times (8.4–)10.6–11.2(–14.5) μm . Conidiomata in contextu hospitis inclusa, solitaria vel aggregata, stromatiformia, globosa, 200–360 μm diametro. Cellulae conidiogenae holoblasticae, hyalinae, subcylindricae, 5–14 \times 3–7 μm , proliferatione percurrenti limitata, ut videtur 1–2 annellationibus paucis, vel in plano eodem periclinaliter incrassate. Conidia brunnea, uniseptata, parietibus crassis, ovoidea, apicibus obtuse rotundato, in fundo obtuse rotundato vel truncata (16–)20.2–20.6(–26) \times (7–)9.2–9.4(–12) μm .

Ascomata dark brown to black, stromatic, pyriform, pseudothecial, isolated or in botryose clusters up to 2 mm diam, initially immersed in host, partially erumpent at maturity, up to 240 μm diam, ostiole circular, central, papillate; wall up to 60 μm thick, of dark brown thick-walled *textura angularis*, and lined with thin-walled, hyaline cells. *Pseudoparaphyses* thin-walled, hyaline, frequently septate, slightly constricted at septum, 3.5–4.5(–5.0) μm wide. *Asci* 100–110 \times 25–30 μm , arising from base of ascoma, stipitate, clavate, thick-walled, bitunicate with a thick endotunica and a well-developed apical chamber, 8-spored, irregularly biseriolate. *Ascospores* oblong, ovate to subclavate, (19–)22.6–23.5(–27) \times (8.4–)10.6–11.2(–14.5) μm (mean \pm S.D. = 23.1 \pm 0.2 \times 10.9 \pm 0.1 μm n = 62) mostly 1-septate, slightly constricted at septum, dark brown, moderately thick-walled, finely verruculose on inner surface, often inequilateral, widest in lower one-third to middle of apical cell, often with a small rounded projection at tip and base of spore, basal cell tapering toward obtuse base. *Conidiomata* pycnidial, separate or aggregated into botryose clusters up to 2 mm diam, individual pycnidia spherical to globose, black, immersed, partially erumpent when mature, unilocular, 200–360 μm diam (mean: 295 μm ; n = 25), thick-walled, wall of three layers: an outer layer of dark brown, thick-walled *textura angularis*, a median layer of dark brown thin-walled cells *textura angularis*, and an inner layer of thin-walled, hyaline cells. *Ostiole* single, central, circular, papillate. *Conidiophores* hyaline, cylindrical, branched. *Conidiogenous cells* discrete or integrated, cylindrical to broad lageniform, (5–)8.6–9.8(–14) \times (3–)4.4–4.9(–7) μm , hyaline, smooth, holoblastic, indeterminate, proliferating at same level to form periclinal thickenings or rarely proliferating percurrently giving rise to 1–2 annellations. *Conidia* brown, oblong to subcylindrical, septate, occasionally slightly constricted at septum, moderately thick-walled, externally smooth, internally finely verruculose, ends rounded, often with a truncate base, (16–)20.2–20.6(–26) \times (7–)9.2–

9.4(–12) μm (mean \pm SD = 20.4 \pm 0.1 \times 9.3 \pm 0.1 μm , n = 200) length/width ratio 2.2 \pm 0.02, n = 200. *Colonies* on PDA reaching 40 mm radius after 3 d at 25 C. Aerial mycelium present, colonies cottony, dark olive to grayish, darkening from the center of the colony after 3 d; colony fully darkened after 6–10 d. Pycnidia produced after 20–30 d in culture at 23 C under near UV black light (12/12 h photoperiod). *Cardinal temperatures for growth*: minimum 5 C, optimum 20–25 C, maximum below 35 C.

Hosts. *Vitis vinifera*.

Geographical range. South Africa, Spain.

Specimens examined. SPAIN. CATALONIA: Vimbodí, near the Monastery of Poblet, on pruned canes of *Vitis vinifera* cv. Garnatxa Negra, 12 Aug 2004, J. Luque & S. Martos, (HOLOTYPE of *Botryosphaeria viticola*, LISE 95177, culture ex type CBS 117009; HOLOTYPE of *Dothiorella viticola*, LISE 95178), on pruned canes of *Vitis vinifera* cv. Garnatxa Negra, 28 May 2003, J. Luque & R. Mateu. Batea, on pruned canes of *V. vinifera* cv. Macabeu, 29 Jul 2004, J. Luque & S. Martos. Bot. on pruned canes of *V. vinifera* cv. Ull de llebre, 29 Jul 2004, J. Luque & S. Martos. Gandesa, on necrotic wood from a diseased branch of *Vitis vinifera* cv. Macabeu, 15 Jun 2004, J. Luque & S. Martos. Sant Esteve Sesrovires, on pruned canes of *V. vinifera* cv. Macabeu, 10 Aug 2004, J. Luque & S. Martos. Sant Sadurní d'Anoia, on pruned canes of *V. vinifera* cv. Xarel·lo, 27 May 2004, J. Luque & J. Reyes.

Notes. The teleomorph is extremely rare compared to the abundant anamorph.

DISCUSSION

In this study *Botryosphaeria viticola* is described as a new species. It is closely related to *B. sarmentorum* and *B. iberica*, according to the morphological data and DNA sequences of the ITS and EF1- α gene regions. Ascospores of these three species are brown and one-septate, which contrasts with the hyaline and aseptate ascospores commonly regarded as typical for *Botryosphaeria* based on *B. dothidea* having *Fusicoccum aesculi* anamorph (Denman et al 2000, Slippers et al 2004). As explained by Phillips et al (2005), these unusual characters can be accommodated in the concept of *Botryosphaeria* as emended by Saccardo (1877). Moreover *B. laricis* and *B. visci* are reported to have brown, one-septate ascospores (Sivanesan 1984), and septation of ascospores has been reported for other *Botryosphaeria* species, albeit after they have aged (Shoemaker 1964, Alves et al 2004). Nevertheless *B. viticola*, *B. sarmentorum* and *B. iberica* are unusual in that their ascospores become brown and septate early in their development. Such features of

the ascospores could place these three species in *Dothidotthia* Höhn. Barr (1972) considered that the only difference between *Botryosphaeria* and *Dothidotthia* is that in *Dothidotthia* the ascospores are brown and septate while in *Botryosphaeria* they are hyaline and aseptate. However the phylogenetic analysis placed these species within *Botryosphaeria* and this raises the possibility that *Dothidotthia* may be a synonym of *Botryosphaeria*. On the other hand it is possible that *Botryosphaeria* is paraphyletic and comprises a number of separate genera. Any decisions on the status of this genus should be made on the basis of data resulting from the analysis of 18S and possibly 28S rDNA sequence data. Furthermore such a study also should take into account a thorough study of *Dothidotthia* to determine its status in relation to *Botryosphaeria*. Nevertheless, considering the data presented here on ITS and EF1- α sequences, *B. viticola*, *B. sarmentorum* and *B. iberica* clearly fall within the species of *Botryosphaeria*.

In the present study isolates of *B. dothidea* lay within a clade separate from the one containing other species with *Fusicoccum* anamorphs. This can be seen in studies of phylogeny of *Botryosphaeria* (e.g. Zhou and Stanosz 2001, Slippers et al 2004, Alves et al 2004). However, with the inclusion of species with *Dothiorella* anamorphs in the present study, the separation of *B. dothidea* from other species with *Fusicoccum* anamorphs is more clearly defined. This is a further indication that *Botryosphaeria* may be paraphyletic.

The anamorphs of *B. iberica*, *B. sarmentorum* and *B. viticola* are morphologically similar; it would be difficult to separate them on morphological characters alone. On the other hand, the teleomorphs show distinctive characters that separate the species from one another. Although the dimensions of ascospores of the three species overlap, they can be distinguished on the morphology of their ascospores. Ascospores of *B. viticola* frequently bore a rounded projection at the tip and base (FIG. 15) and taper more strongly to the base than in *B. iberica*. While *B. iberica* has been found mainly on *Quercus* spp. and *B. sarmentorum* on several hosts other than *Quercus* (Phillips et al 2005), *B. viticola* appears to be restricted to grapevines. However it is not known if host association is a consistent character for these three species.

To our knowledge *Botryosphaeria viticola* is the third known species together with *B. iberica* and *B. sarmentorum* with anamorphs in *Dothiorella*. *Dothiorella* differs from *Diplodia* in morphological and molecular characteristics (Phillips et al 2005). Conidia of *Dothiorella* become brown and septate at an early stage, even before dehiscence from the conidiogenous cell, whereas conidia in *Diplodia* are hyaline and become dark and septate only with age

(Shoemaker 1964, Alves et al 2004, Phillips et al 2005). This distinction has not always been recognized, with the result that the genus *Diplodia* has been used frequently for species with brown, one-septate conidia (Wollenweber 1941). It is possible that many of the species placed in *Diplodia* would be better accommodated in *Dothiorella*. Judging from the number of synonyms listed by Wollenweber (1941) for *D. sarmentorum*, many of these species are inseparable morphologically. However, as shown in this study and that of Phillips et al (2005), although the anamorphs of *B. sarmentorum*, *B. iberica* and *B. viticola* are indistinguishable morphologically, they can be separated on morphology of the teleomorphs and these differences are well supported by the ITS and EF1- α sequence data.

The isolate CBS 117006 exhibited some differences in culture morphology from the other isolates studied. The reverse side of colonies of CBS 117006 became red-brown after 3–5 d on PDA at 25 C, with a progressive darkening of the pigment after 6–10 d. Such coloration was not seen in the other isolates of *B. viticola*. Furthermore there were some small differences in ITS and EF1- α sequences between isolates of *B. viticola* (one substitution and one deletion in ITS and nine substitutions in EF). This was reflected in the phylogeny where two isolates from Spain clustered with two isolates from South Africa, but isolate CBS 117006 fell outside this *B. viticola* subclade. These differences in nucleotide sequences and colony morphology are regarded as intraspecific variation.

Van Niekerk et al (2004) studied a *Diplodia* sp. from pruned canes in South Africa with morphological characters that fit within the description of *Dothiorella viticola*. The phylogenetic analysis in our study showed clearly that two isolates of this *Diplodia* sp. (CBS 112869, CBS 112870) clustered with other isolates of *B. viticola*, which supports the identification of this fungus as *B. viticola*. The known occurrence of *B. viticola* in Spain and South Africa would suggest that this species may be widely distributed, possibly wherever grapevines are grown. *Botryosphaeria viticola* appears to be a saprophyte, according to the results obtained by van Niekerk et al (2004) in different pathogenicity tests with the strain CBS 112869. Furthermore *B. viticola* has been found mainly on old, discarded pruned canes and has not been associated with any disease symptoms, thus reinforcing the notion that it may be a saprophytic species.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

under project RTA03-058-C2-1 (Spain) and by the European Regional Development Fund and Fundação para a Ciência e a Tecnologia under project POCTI/AGR/56140/2004 (Portugal). Soledad Martos was supported by a grant from DURSI-AGAUR (Regional Government of Catalonia, Spain). We thank these viticulturists and wine producers for letting us survey their vineyards (Spain): Miguel Torres, Ca n'Estella, Joaquim Aguiló, Raventós i Blanc and Rosend Esteve.

LITERATURE CITED

- Alves A, Correia A, Luque J, Phillips AJL. 2004. *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96:598-613.
- Barr ME. 1972. Preliminary studies on the Dothideales in temperate North America. *Contr Univ Michigan Herb* 9:523-638.
- Carbone I, Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Crous PW, Palm ME. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 51:161-175.
- Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang J-C, Pascoe I, Wingfield MJ. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud Mycol* 45:129-140.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano TA. 1985. Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. *J Mol Evol* 22:160-174.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182-192.
- 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.
- Saccardo PA. 1877. *Fungi veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi*. *Michelia* 1:1-72.
- Shoemaker RA. 1964. Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Can J Bot* 42:1297-1303.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst Biol* 49:369-381.
- Sivanesan A. 1984. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. Vaduz, Liechtenstein: J Cramer. 701 p.
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.
- Van Nickerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, Halleen F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96:781-798.
- Von Arx JA. 1987. *Plant Pathogenic Fungi*. Nova Hedwigia Beih 87:288p.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press. p 315-322.
- Wollenweber HW. 1941. *Diplodia sarmentorum* Fries und ihre Verbreitung. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd* 103:347-357.
- Young ND, Healy J. 2003. GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4: art. 6.
- Zhou S, Stanosz GR. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8s rDNA sequences. *Mycologia* 93:516-527.

