



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



**PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOLOGÍA
PROBIOL**

**Trabajo de Tesis presentado como requisito para optar
al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE
Botryosphaeriaceae DE ARGENTINA Y
ESTUDIOS DE TOLERANCIA DE *Vitis* spp.
FRENTE A SU ATAQUE.**

**Autora: Ms. Sc. Cecilia
Césari**

**Directora: Dra. Liliana
Martínez**

**Comité tutorial: Dra. M. Fernanda Silva
Dra. Sandra García-Lampasona**

**Mendoza, Argentina
2015**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Liliana Martínez, por su tiempo, paciencia y su inestimable ayuda. Por su motivación continua y la confianza depositada en mí.

A Ing. Agr. Marta Gatica, guía insustituible para mis proyectos académicos. Por permitirme entrar en el mundo de la fitopatología y por su permanente estímulo de aprendizaje y desarrollo tanto en lo profesional como en lo personal.

A la Dra. Georgina Escoriaza, mi compañera y consejera. Por todos los años y experiencias compartidas, por su continuo apoyo y recomendaciones.

A la Ing. Agr. Fernanda Arias, por su continua ayuda, ánimo y compañía.

Al Sr. Sergio Salas y la Bromatóloga Sandra D'Innocenzo, por su colaboración permanente en la tarea diaria.

Al Ing. Miguel Cirrincione y el Sr. Javier Guzmán, por su trabajo en la micropropagación, rusticación y acondicionamiento de plantas de vid, y aporte de medios de cultivo para los ensayos.

Al Dr. Martin Fanzone, Lic. Mariela Assof y la Dra. Viviana Jofré, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su afectuosa predisposición e interés.

A las Dras. M. Fernanda Silva y Sandra García Lampasona, por su dedicación y sus acertadas sugerencias en la realización de este trabajo.

Al personal de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, por su cordial disposición al permitirme trabajar en su laboratorio y proporcionarme los equipos e instalaciones necesarios. A Martin Duran, por transmitir sus conocimientos y su ayuda.

Al INTA, que ha financiado el desarrollo de mis actividades y especialmente al Director de la EEA Mendoza, Dr. José Gudiño, por el apoyo brindado.

A compañeros de la EEA Mendoza INTA, que contribuyeron de distinta manera para que la culminación de este trabajo se hiciera realidad, muy especialmente a la Sra. Norma Pieralisi, M. Sc. Valeria Longone, M. Sc. Eduardo Tersoglio, Dr. Sebastián Gomez Talquenca, Dra. Melissa Lanzavolpe.

A mi familia. A mis padres, ejemplos de ternura y superación, que siempre me han animado a seguir adelante, por el esfuerzo volcado durante toda una vida a mi lado, gracias. A Matilde, mi apoyo incondicional, por su aliento y el amor de todos los días. A Pablo, por su apoyo y comprensión, por haber esperado todo este tiempo. A mi abuela Matilde, la adoro y a mi hermano Gerardo y su familia.

Y dedicárselo a Joaquín y Nicolás, fuerza que me impulsa, con todo mi cariño y desvelo.

MUCHAS GRACIAS, a todos.

La Tesis Doctoral “**Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Botryosphaeria* spp. de Argentina y estudios de tolerancia de *Vitis* spp. frente a su ataque**” se realizó en los Laboratorios de Fitopatología y de Aromas, de la Estación Experimental Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

La misma, responde a una Beca de perfeccionamiento de INTA. El financiamiento se efectuó en el marco de Proyectos INTA y extraINTA, enfocados al estudio de las enfermedades de madera de la vid, particularmente al desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular que permitan la detección de los agentes que las producen y asimismo, la evaluación de soluciones preventivas. AEPV-214012 (2010-2012) Identificación, producción de reactivos de diagnóstico. Caracterización y análisis de la variabilidad de patógenos; AEPV-214022 (2010-2012): Caracterización de las interacciones planta patógeno y de mecanismos de resistencia de cultivos a patógenos y de éstos a productos fitosanitarios; PNFRU 0528310 (2010-2012): Generación y desarrollo de tecnología para la prevención de enfermedades emergentes, cuarentenarias y limitantes en frutales y Proyecto PICT-2361 (2010-2014): Evaluación de la expresión génica de vid sometidas a estreses bióticos: leafroll, *Botryosphaeria* spp. y diferentes elicitores.

En primer lugar, una síntesis bibliográfica aporta conocimientos científicos esenciales y necesarios en lo que concierne a la viticultura, las enfermedades de la vid y la interacción planta-patógeno. El manuscrito está distribuido en tres Capítulos independientes, el primero es resultado de la investigación bibliográfica inicial sobre los temas de estudio, el segundo, trata sobre la caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Botryosphaeria* spp. en Argentina, y el tercero, acerca de estudios de tolerancia de *Vitis* spp. frente a la inoculación de *Lasiodiplodia theobromae* puntapié inicial para futuros estudios de expresión génica de una vid tolerante y una vid susceptible frente a *Botryosphaeriaceae*. Cada capítulo consta de una introducción, Materiales y métodos, resultados y Discusión y bibliografía consultada para su desarrollo. Al final de la memoria se recogen las principales Conclusiones generales en el Capítulo IV.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|--|--|
| ABA, AJ, MeJ, ET, AS | Ácido abscísico, Metil jasmonato, Etileno, Ácido jasmónico, Ácido salicílico |
| ADN, ARN | Ácido Desoxiribonucleico, Ácido Ribonucleico |
| AEM, APG | Agar extracto de malta, Agar papa glucosado |
| AFLPs | Amplified Fragment Polymorphism = Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos amplificados |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| CoA | Coenzima A |
| ° C | Grados centígrados |
| cm, mm, µm, nm | Centímetro, milímetro, micrómetro, nanómetro |
| cm ³ , mm ³ | Centímetro cúbico, milímetro cúbico |
| cv | Cultivar |
| d, h, min, s | Día, hora, minuto, segundo |
| g, mg, µg, ng | Gramo, miligramo, microgramo, nanogramo |
| ha, Mha | Hectáreas, Millones de hectáreas |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| L, ml, µl | Litro, mililitro, microlitro |
| M, mM, µM, nmoles, ppm | Molar, milimolar, micromolar, nanomoles, partes por millón |
| N° | Número |
| n/d | No detectado |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>Pm.</i> | <i>Phaeoacremonium</i> |
| RAPDs | Random Amplified Polymorphic DNA = Polimorfismo de ADN amplificado por cebadores arbitrarios |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SAR, ISR | Resistencia sistémica adquirida, Resistencia sistémica inducida |
| sp., spp. | Especie, Especies |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Volumen por volumen |
| V. Test | Valor de Test |
| µE | Microeinstein |
| % | Valor porcentual |
| Cl ₂ Mg, H ₂ O, H ₃ BO ₃ | Cloruro de magnesio, Agua, Ácido Bórico |

Índice

| | pagina |
|---|-------------|
| Listado de Figuras | VIII |
| Listado de Tablas | XII |
| Resumen | XIV |
| CAPITULO I. Introducción | |
| 1. Introducción | 17 |
| 1.1. La vid..... | - |
| Origen y taxonomía..... | - |
| Importancia del sector vitivinícola..... | 18 |
| Características botánicas y reproducción de la vid..... | 20 |
| Características anatómicas de la madera de la vid..... | 21 |
| 1.2. Aspectos fitosanitarios de la viticultura..... | 23 |
| 1.3. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Panorama mundial..... | 25 |
| 1.4. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid en Argentina..... | 30 |
| Epidemiología de Hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes..... | 33 |
| Estrategias de control de enfermedades de madera de la vid..... | 34 |
| 1.5. Mecanismo de defensa de las plantas..... | 35 |
| 1.6. Mecanismos de defensa en <i>Vitis vinifera</i> | 40 |
| 1.7. Justificación del trabajo. Hipótesis y objetivos..... | 43 |
| Bibliografía | 46 |
| CAPITULO II. Caracterización de aislamientos argentinos de hongos del género <i>Botryosphaeriaceae</i> | |
| 2.1. Introducción | 66 |
| 2.1.1. Hospederos y síntomas de la familia <i>Botryosphaeriaceae</i> | - |
| 2.1.2. Taxonomía de <i>Botryosphaeriaceae</i> | 68 |
| 2.1.3. Biología de <i>Botryosphaeriaceae</i> | 69 |
| 2.1.4. Características morfológicas de <i>Botryosphaeriaceae</i> | 70 |
| 2.1.5. Identificación molecular de <i>Botryosphaeriaceae</i> | - |
| 2.2. Materiales y métodos | 74 |
| 2.2.1. Material fúngico..... | - |
| 2.2.2. Estudio de la variabilidad fenotípica de aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> | 78 |
| 2.2.3. Caracterización molecular de aislamientos e identificación de especies..... | 81 |
| 2.3. Resultados | 89 |
| 2.3.1. Material fúngico..... | - |

| | pagina |
|--|------------|
| 2.3.2. Estudio de la variabilidad fenotípica de aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> | 91 |
| 2.3.3. Caracterización molecular de aislamientos e identificación de especies..... | 104 |
| 2.4. Discusión y Conclusiones | 119 |
| Bibliografía | 127 |
| CAPITULO III. Estudios de tolerancia de <i>Vitis</i> spp. frente al hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | |
| 3.1. Introducción | 142 |
| 3.1.1. Los compuestos fenólicos en las plantas..... | - |
| 3.1.2. Biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas..... | 143 |
| 3.1.3. Compuestos fenólicos detectados en vid..... | 144 |
| 3.1.4. Métodos utilizados en la cuantificación de estilbenos..... | 147 |
| 3.1.5. Métodos de extracción para determinar estilbenos por HPLC en hojas de vid..... | 150 |
| 3.1.6. Sistemas de estudio de los compuestos fenólicos en vid frente a hongos asociados a enfermedades de madera..... | 151 |
| 3.2. Materiales y Métodos | 155 |
| Producción de plantas <i>in vitro</i> | - |
| Establecimiento y mantenimiento de vides en maceta en condiciones de invernáculo..... | - |
| 3.2.1. Análisis de respuesta de defensa de <i>Vitis</i> spp. mantenidas en invernáculo frente al hongo <i>L. theobromae</i> | 156 |
| Material fúngico..... | - |
| Inoculaciones y parámetros de crecimiento evaluados..... | 157 |
| 3.2.2. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas en invernáculo e inoculadas con el hongo <i>L. theobromae</i> | 158 |
| a) Puesta a punto de método de extracción de resveratrol..... | - |
| b) Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)..... | 160 |
| 3.2.3. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas <i>in vitro</i> e inoculadas con el hongo <i>L. theobromae</i> | 161 |
| Inoculaciones y parámetros de crecimiento evaluados..... | - |
| Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC-DAD)..... | - |
| 3.2.4. Análisis de los datos..... | 162 |
| 3.3. Resultados | 163 |
| Producción de plantas <i>in vitro</i> | - |
| Establecimiento y mantenimiento de vides en maceta en condiciones de invernáculo..... | - |
| 3.3.1. Análisis de respuesta de defensa de <i>Vitis</i> spp. mantenidas en invernáculo frente al hongo <i>L. theobromae</i> | 164 |

| | pagina |
|--|------------|
| 3.3.2. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas en invernáculo e inoculadas con el hongo <i>L. theobromae</i> | 167 |
| a) Puesta a punto de método de extracción de resveratrol..... | - |
| b) Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)..... | 168 |
| 3.3.3. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas <i>in vitro</i> e inoculadas con el hongo <i>L. theobromae</i> | 170 |
| Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC-DAD)..... | 172 |
| 3.4. Discusión y Conclusiones..... | 174 |
| Bibliografía..... | 182 |
| CAPITULO IV. Conclusiones Generales..... | 199 |
| Conclusiones generales y perspectivas futuras..... | 200 |
| ANEXOS..... | 203 |

LISTADO de FIGURAS

| | página |
|--|--------|
| Figuras Capítulo I | |
| Figura 1.1. Regiones vitivinícolas de Argentina (A) y regiones vitivinícolas de la Provincia de Mendoza (B)..... | 19 |
| Figura 1.2. Síntomas característicos del complejo Esca. A y B: decoloraciones internervales en hoja de un cultivar blanco (A) y de un cultivar tinto (B). C y D: cortes transversales de la madera con necrosis blanca esponjosa (Bruez, 2013; Larignon, 2012)..... | 26 |
| Figura 1.3. Sintomatología de la enfermedad de Petri. A: cepas jóvenes con brotación deficiente y clorosis en hojas. B: Sección transversal de tallo con vasos oscurecidos alrededor de la médula. C: corte transversal con exudados gomosos oscuros en los vasos (Gramaje y Armengol, 2011; Larignon, 2012)..... | 27 |
| Figura 1.4. Síntomas de Brazo negro muerto. A: detalle de hojas con las decoloraciones características. B y C: cortes transversales en los que se observa la necrosis sectorial característica. D: cepa descortezada en la que se observa la necrosis longitudinal (Bruez, 2013; Larignon, 2012)..... | 28 |
| Figura 1.5. Síntomas característicos de la <i>Eutipiosis</i> . A y B: Brotaciones débiles. C: corte transversal de la madera con necrosis característica (Andolfi <i>et al.</i> 2011; Bruez, 2013)..... | 29 |
| Figura 1.6. Cepa joven afectada por Pie negro. A: síntomas foliares de Pie negro. B: detalle de las raíces en dos planos. C: corte longitudinal con vasos necrosados. C: corte transversal con necrosis de la madera (Chantal Probst, 2011; Larignon, 2012)..... | - |
| Figura 1.7. Síntomas en corte transversal de troncos de vides jóvenes. A: detalle de necrosis producida por <i>Verticilosis</i> . B: necrosis característica de <i>Fusariosis</i> . D: cepa descortezada en la que se observa la necrosis longitudinal (Bruez, 2013; Larignon, 2012)..... | - |
| Figura 1.8. Brotes y hojas del cv. Chenin con síntomas típicos de Hoja de malvón. A: síntomas en hojas en el cv. Torrontés riojano. B: detalle de enrollamiento de hoja. C: brotes débiles, de entrenudos cortos y hojas cloróticas..... | 31 |
| Figura 1.9. A: muerte parcial de brazos en el cv. Chenin. B: presencia de cuerpos fructíferos del basidiomicete <i>Inocutis jamaicensis</i> en tronco del cv. Chenin..... | - |
| Figura 1.10. Síntomas de necrosis en madera, en cortes transversales de tallos de vides afectadas con Hoja de malvón..... | - |
| Figura 1.11. Cepa joven del cv. Chardonnay afectada con decaimiento de vides con brotación débil A: detalle de síntoma en hoja en cv Malbec de < 10 años..... | 32 |
| Figura 1.12. Cortes transversales de tallos de vides jóvenes con decaimiento..... | 33 |

| | página |
|--|--------|
| Figuras Capítulo II | |
| Figura 2.1. Esquema de una unidad de ADNr y localización de los iniciadores universales ITS4, ITS1 y NL4 utilizados (Slippers <i>et al.</i> , 2004a)..... | 71 |
| Figura 2.2. Posiciones a lo largo del eje de una vid injertada de ≤ 10 años (A) y de una cepa de > 11 años (B) a partir de las cuales se realizaron los aislamientos de colonia..... | 74 |
| Figura 2.3. Secciones transversales de tronco de vides maduras con Hoja de malvón con síntomas internos (a) y sintomatología característica en follaje (b): deformación de hojas, clorosis, brotes con entrenudos cortos y muerte progresiva iniciando por un brazo..... | 89 |
| Figura 2.4. (a) Secciones transversales de tallos con síntomas internos, obtenidos de vides jóvenes argentinas con decaimiento, (b) oscurecimiento de vasos, necrosis marrón sectorial y estrías marrones longitudinales, (c) crecimiento reducido y clorosis en hojas..... | 90 |
| Figura 2.5. Necrosis de madera de vides con decaimiento a partir de las cuales se obtuvieron aislados de <i>Botryosphaeriaceae</i> . Necrosis blanda color claro (a); línea negra (b); zona de color castaño bordeando a la línea negra (c); necrosis sectorial dura de color castaño (d), puntos necróticos negros (p) y vasos oscurecidos radialmente alrededor del cilindro central..... | 91 |
| Figura 2.6. Aspecto del anverso de cultivos de <i>Botryosphaeriaceae</i> en medio APG a los 7 días de crecimiento, a 25 °C, en oscuridad en los distintos tipos de colonias A, B, C, D y E..... | 92 |
| Figura 2.7. Aspecto de micelio y conidios de <i>Botryosphaeriaceae</i> después de 30 días de cultivo en medio Agar Agua con adición de palillos. El aislamiento identificado como B3709 corresponde al grupo tipo A; El aislamiento B1707 representa al grupo tipo E y el aislamiento B1507 representa al grupo tipo C..... | 93 |
| Figura 2.8. Conidios de distintas especies de <i>Botryosphaeriaceae</i> encontrados en vid, incubados 20 días, a 25°C en oscuridad y APG 2%. a) <i>Diplodia seriata</i> , b) <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , c) <i>Diplodia mutila</i> (fotos superiores: observados con microscopio con aumento 40x y fotos inferiores: con aumento 100 X)..... | 96 |
| Figura 2.9. Diagramas Box plots ilustran la distribución de longitud (L) en μm , ancho (A) en μm y relación L/A de aislamientos que esporularon, de <i>Botryosphaeriaceae</i> aislados de vides con enfermedades de madera en Argentina (n=4, con cuatro plantas por repetición) medidos a los 21 días post-inoculación | - |
| Figura 2.10. Proyección de patrones identificados y aislamientos argentinos de <i>Botryosphaeriaceae</i> que esporularon y se caracterizaron en principio, por sus características morfológicas, sobre el primer plano factorial seleccionado del análisis de Componentes principales en función de las variables tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Las nomenclaturas: LU, ST, PA, DO, OB y TH correspondieron a los patrones de <i>Neofusicoccum luteum</i> , <i>Diplodia mutila</i> , <i>Neofusicoccum parva</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Diplodia seriata</i> y <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Todos los puntos de colores tienen una designación aunque no estén editados en el gráfico..... | 99 |

Figuras Capítulo II

| | |
|--|------------|
| Figura 2.11. Proyección de todos los aislados de <i>Botryosphaeriaceae</i> estudiados, sobre el primer plano factorial seleccionado del ACP en función de las variables tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Las nomenclaturas: LU, ST, PA, DO, OB y TH correspondieron a los patrones de <i>Neofusicoccum luteum</i> , <i>Diplodia mutila</i> , <i>Neofusicoccum parva</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Diplodia seriata</i> y <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Todos los puntos de colores tienen una designación aunque no estén editados en el gráfico..... | 100 |
| Figura 2.12. Sintomatología observada en las pruebas de patogenicidad. Tres plantas <i>in vitro</i> de <i>V. Rupestris</i> con síntomas grado 3 según Zanzotto <i>et al.</i> (2008), a los cuatro días de la inoculación con <i>L. theobromae</i> (A) y tres testigos sanos (B)..... | 103 |
| Figura 2.13. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de <i>L. theobromae</i> extraído por el método A (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y método E (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, Primera columna de la izquierda)..... | 106 |
| Figura 2.14. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de <i>L. theobromae</i> extraído por el método B (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y método D (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, Primera columna de la izquierda)..... | - |
| Figura 2.15. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de <i>L. theobromae</i> extraído por el método C (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y método F (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, Primera columna de la izquierda)..... | - |
| Figura 2.16. Geles de agarosa al 1,2 % teñidos con bromuro de etidio donde se observan los productos amplificados del ITS del ADN ribosomal, de aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> , luego de su restricción enzimática con las enzimas <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>NciI</i> , <i>Taq</i> y <i>AluI</i> . Se utilizaron los marcadores de peso molecular Lambda y 100 bp y se señalaron los perfiles de restricción definidos para cada enzima, con recuadro amarillo..... | 108 |
| Figura 2.17. Patrones de restricción de los productos amplificados del ITS del ADN ribosomal de aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> , para cada enzima y distribución de los aislamientos identificados..... | 109 |
| Figura 2.18. Dendrogramas obtenidos a partir de la restricción enzimática de los productos de la amplificación de fragmentos específicos del ADN ribosomal de aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> . En el dendrograma superior, se ilustran cinco grupos con el 66 % de similitud y en el dendrograma inferior se ilustran 12 grupos con el 81,8 % de similitud de acuerdo con el coeficiente de similitud de Simple Matching | 111 |
| Figura 2.19. Secuencias obtenidas con los primers ITS-4, de aislamientos representativos de los cuatro grupos “tipo” caracterizados morfológicamente: B0301 (<i>N. luteum</i>), B1507 (<i>D. seriata</i>), B1307 (<i>D. mutila</i>), B0407 (<i>B. dothidea</i> , anamorfo <i>F. aesculi</i>) y B0000 (<i>L. theobromae</i>)..... | 112 |
| Figura 2.20. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino B0000 y la accesión IDF814723 del GenBank (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>)..... | 113 |

| | página |
|--|---------------|
| Figuras Capítulo II | |
| Figura 2.21. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino <i>B1507</i> y la accesión IDQ356355 del GenBank (<i>Diplodia seriata</i>)..... | 114 |
| Figura 2.22. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino <i>B1307</i> y la accesión IEU030326 del GenBank (<i>Diplodia mutila</i>)..... | 115 |
| Figura 2.23. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino <i>B0307</i> y la accesión IHQ392717 del GenBank (<i>Neofusicoccum luteum</i>)..... | 116 |
| Figura 2.24. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino <i>B0407</i> y la accesión IDQ233602 del GenBank (<i>Botryosphaeria dothidea</i> , anamorfo <i>Fusicoccum aesculis</i>)..... | 117 |

| | página |
|---|--------|
| Figuras Capítulo III | |
| Figura 3.1. Vía de síntesis simplificada de fenilpropanoides (Fanzone, 2012). C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa; CHS: chalcona sintasa; PAL: fenilalanina amonioliasa; STS: estilbeno sintasa..... | 144 |
| Figura 3.2. Formación de los estilbenos a través de la STS y ejemplos de transformaciones comunes que sufren estos compuestos..... | 146 |
| Figura 3.3. Solventes orgánicos utilizados para la extracción de estilbenos..... | 151 |
| Figura 3.4. Vides <i>in vitro</i> obtenidas por establecimiento de los segmentos uninodales en medio de micropropagación de vid MS..... | 163 |
| Figura 3.5. Plantas en maceta que se desarrollaron a partir de la rusticación de plantas <i>in vitro</i> | - |
| Figura 3.6. Síntomas observados en vides inoculadas con <i>L. theobromae</i> , a los 21 días de inoculación. (A) y (B) hojas secas, enrojecimiento y muerte del brote inoculado, (C) controles inoculados sin muerte de brotes..... | 164 |
| Figura 3.7. Avance de necrosis y producción de micelio en punto de inoculación en planta de Malbec inoculada con <i>L. theobromae</i> (B) y control sin síntomas (A), a los 21 días de inoculación..... | 165 |
| Figura 3.8. Susceptibilidad/Tolerancia de <i>Vitis</i> spp. a <i>L. theobromae</i> . Diagramas Box plots ilustran la distribución de concentraciones de estilbenos en plantas mantenidas en condiciones de invernáculo (n=4 cuatro plantas por repetición) medidos a los 21 días post-inoculación. Se evaluaron los siguientes cultivares: portainjerto 110R, portainjerto 5BB, Chardonnay (CHA), Criolla Chica (CR), Malbec (MA), Pedro Gimenez (PG), Pinot Noir (PN), <i>Vitis riparia</i> (RI) y <i>Vitis rupestris</i> (RU)..... | 169 |
| Figura 3.9. Plantas <i>in vitro</i> de la cv. Malbec y de <i>Vitis rupestris</i> , de 60 días, inoculadas con <i>L. theobromae</i> (B) y controles inoculados con micelio APG estéril (A). Primeros síntomas en hoja en el cv. Malbec a las 48 h post-inoculación (C)..... | 171 |
| Figura 3.10. Gráficos de barras con las concentraciones medias de <i>Trans</i> -resveratrol y derivados glicosidados (n=3) obtenidas a las 8, 24, 48 y 72 h desde la inoculación con <i>L. theobromae</i> , por HPLC para las variedades Malbec y <i>V. rupestris</i> . Los valores resaltados y barras rellenas, corresponden a valores significativos por la Prueba de Chi cuadrado..... | 173 |

LISTADO de Tablas

| | página |
|--|--------|
| Tablas Capítulo II | |
| Tabla 2.1. Número de vides extraídas en las distintas regiones prospectadas (total=103)..... | 75 |
| Tabla 2.2. Procedencia de los aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> en estudio..... | 76 |
| Tabla 2.3. Listado de cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR de las regiones ITS completa (ITS1 e ITS2) y el gen 5.8S del ARNr, gen de la β -tubulina y NL4 de especies de la familia <i>Botryosphaeriaceae</i> | 85 |
| Tabla 2.4. Composición de la reacción de amplificación de las regiones ITS completa (ITS1 y ITS2) y el gen 5.8S del ARNr, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 | - |
| Tabla 2.5. Composición de la reacción de digestión con endonucleasas de restricción..... | 86 |
| Tabla 2.6. Tipo de micelio; producción de pigmento; producción de conidios; forma, color, septación, longitud, ancho y relación L/A de conidios, de aislamientos identificados de <i>Botryosphaeriaceae</i> obtenidos de vides con enfermedades de madera en Argentina. El término s/d corresponde a in descripción debido a que los aislamientos no esporularon en laboratorio..... | 95 |
| Tabla 2.7. Valores significativos de superficie de colonia promedio (mm ²), en APG y oscuridad, de 76 <i>Botryosphaeriaceae</i> spp. mantenidos a diferentes temperaturas en un rango de 5 a 40 °C en función del tiempo (Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba asimismo, se describe el p-value asociado)..... | 97 |
| Tabla 2.8. Tasa de crecimiento (mm ² día ⁻¹) de los aislamientos de <i>Botryosphaeriaceae</i> a distintas temperaturas en APG y oscuridad (Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba asimismo, se describe el p-value asociado)..... | 101 |
| Tabla 2.9. Comparación de tiempo de procesamiento, concentración, rendimiento y pureza entre las muestras de ADN extraídas de <i>L. theobromae</i> por los diferentes métodos de extracción de ADN empleados..... | 105 |
| Tabla 2.10. Identificación de las secuencias obtenidas de 21 aislamientos de especies de <i>Botryosphaeriaceae</i> por comparación en la base de datos del GenBank: identificación de aislamientos argentinos secuenciados, procedencia e identificación de especie obtenida, número de acceso en la base de datos del GenBank, p-value del alineamiento (p<0,005 es significativo), % de la secuencia de cada aislamiento argentino que es alineado con la accesión y % de similitud con las secuencias contrastadas, que establece la identificación de cada especie..... | 118 |

| | página |
|--|--------|
| Tablas Capítulo III | |
| Tabla 3.1. Evaluación de métodos de extracción en un diseño factorial (Design Expert 7) con cinco variables de extracción, en condiciones de oscuridad. MeOH = Metanol grado analítico para HPLC; MeOH / H ₂ O = Metanol grado analítico para HPLC en solución acuosa 8:2..... | 159 |
| Tabla 3.2. Diagrama de flujo del gradiente de solventes para la separación cromatográfica por HPLC-DAD. | 160 |
| Tabla 3.3. Variables asociadas a tolerancia de vides frente a <i>L. theobromae</i> , mantenidas durante 21 días en invernáculo (Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba)..... | 166 |
| Tabla 3.4. Resultados de ANOVA multifactorial mostrando la significancia de distintos factores considerados en la extracción de compuestos fenólicos de hoja de <i>Vitis</i> (Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba)..... | 167 |
| Tabla 3.5. Absorbancia media (n=3) obtenida por espectrofotometría y desvío típico correspondiente a las distintas modalidades de cada variable de extracción de compuestos fenólicos (Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba)..... | 168 |
| Tabla 3.6. Valores críticos de prueba (valores Test) y probabilidades asociados a la Prueba de significación estadística para la variable: cultivar de vid..... | 169 |
| Tabla 3.7. Concentraciones de <i>Trans</i> -resveratrol y derivados <i>Trans</i> -resveratrol y <i>Cis</i> -resveratrol glicosidados (n=3) obtenidas por HPLC y desvío típico correspondiente. El Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba..... | 170 |
| Tabla 3.8. Número de plantas <i>in vitro</i> de Malbec y <i>Vitis rupestris</i> con síntomas, en plantas inoculadas con <i>L. theobromae</i> y controles | 171 |

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Botryosphaeriaceae* DE ARGENTINA Y ESTUDIOS DE TOLERANCIA DE *Vitis spp.* FRENTE A SU ATAQUE

Las enfermedades de madera causan importantes reducciones de productividad y calidad en vid y no existen estrategias efectivas para reducir su incidencia. En nuestro país, se han observado especies de *Botryosphaeriaceae* aún no identificadas, asociadas frecuentemente a vides afectadas, por lo que se muestrearon vides con síntomas de hoja de malvón y decaimiento en provincias productoras argentinas, con el objeto de obtener aislamientos; caracterizarlos a través de métodos morfológicos, optimizar técnicas de extracción, amplificación y secuenciación de ADN para una detección rápida y determinar la diversidad de especies presentes en Argentina. Se obtuvieron y caracterizaron 76 colonias según: superficie (mm^2), pigmentación difusible (si o no), textura, márgenes y producción de conidios a los 7-14 días en oscuridad, a 25 °C y en medio APG al 2 %. Asimismo, se evaluaron la longitud (μm), el ancho (μm), la relación longitud/ancho, la presencia de septo y color de conidios de los aislamientos que esporularon. Además, se incubaron los aislamientos y cepas de referencia en medio APG 2 % y oscuridad, a las temperaturas 5, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C y se calculó la superficie total de colonia (mm^2) y tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) para cada aislamiento y temperatura. Se determinó patogenicidad y se caracterizaron seis grupos “tipo” de aislamientos que se correspondieron con las especies *Lasiodiplodia theobromae* (33), *Diplodia seriata* (24), *Diplodia mutila* (8), *Neofusicoccum luteum* (7), *Botryosphaeria dothidea* (*Anamorfo Fusicoccum aesculi*) (6), respectivamente. Se extrajo ADN de 76 aislamientos mediante el kit Qiagen Dneasy Plant. Se amplificaron por PCR las regiones del espaciador interno transcrita del ADN ribosomal (ITS) con los cebadores ITS1 e ITS4, del gen que codifica para la proteína β -tubulina con los cebadores Bt2a y Bt2b y del gen NL4 con los cebadores ITS1 y NL4. Posteriormente, los productos de PCR para ITS de 29 aislados representativos de los grupo “tipo”, se sometieron a restricciones con las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *CfoI*, *NciI* y *Taq*, posteriormente, 21 de ellos se purificaron y se secuenciaron. Las amplificaciones de la región ITS, mostraron fragmentos monomórfico de 580 pb en todos los aislamientos y al digerir los productos, se observó polimorfismo, encontrándose 2 a 4 bandas por muestra. Se visualizaron entre 4 (*CfoI*), 5 (*HaeIII*), 6 (*NciI* y *Taq*) y 9 (*AluI*) patrones diferentes, sugiriéndose la existencia de especies de *Botryosphaeria* no citadas en Argentina. Finalmente se discriminaron consistentemente por secuenciación, las especies: *L. theobromae*, *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. luteum* y *D. mutila*.

En respuesta al objetivo de optimizar los protocolos de obtención de vides en condiciones *in vitro* y de invernáculo, se lograron plantas de *Vitis vinifera* L. cvs Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis spp.* (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, libres de virus

y enfermedades. Asimismo, se lograron aclimatar en condiciones de invernáculo, plantas en maceta provenientes de plantas mantenidas *in vitro*.

La observación de vides con diferente grado de susceptibilidad a enfermedades de madera, promovieron la hipótesis del incremento de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) en plantas tolerantes, por lo que se evaluó la susceptibilidad de cinco variedades de *V. vinifera* y cuatro de *Vitis* spp. a través de la inoculación con *L. theobromae* a fines de: identificar y evaluar respuestas de defensa de *Vitis* spp., desarrollar un método de extracción e identificación de resveratrol y/o sus derivados en hoja, determinar si el ataque del hongo promueve su producción y definir una escala de tolerancia en función de las respuestas de defensa. Luego de 21 días de cultivo en invernáculo, se evaluaron: presencia de síntomas, % de plantas con síntomas, % de muerte de hojas, grado de síntomas en lesión producida y contenidos de clorofila. Las plantas inoculadas disminuyeron significativamente el contenido de clorofila y aumentó el % de plantas con síntomas y % de muerte de hojas, respecto de los testigos. La variedad *Malbec*, fue la que mostró mayor susceptibilidad, con altos % de plantas muertas, de hojas muertas por planta y menor contenido de clorofila y en contraposición, *V. rupestris* fue más tolerante. Con el objetivo de estudiar en el sistema *in vitro*, la producción de resveratrol en una variedad susceptible y una tolerante, se inocularon plantas cv. *Malbec* y de *V. rupestris* con *L. theobromae* y se determinaron los síntomas desde las 8 a 120 h post-inoculación. Posteriormente, se obtuvieron extractos de hoja con metanol en frío y ultrasonido (n=3) y se analizaron por HPLC-DAD *trans*-resveratrol y sus derivados glicosidados. Se observaron hojas necróticas y muerte de tallos desde las 24 h post-inoculación hasta la muerte, en *Malbec* (4^{to} día) y *V. rupestris* (6^{to} día). En *Vitis rupestris* inoculadas, se detectaron significativamente *trans*-resveratrol, *trans*-resveratrol glicosidado y *cis*-resveratrol glicosidado, 8 h (4.29 ± 2.78 $\mu\text{g/g}$; 16.74 ± 0.45 $\mu\text{g/g}$; 9.53 ± 0.45 $\mu\text{g/g}$) y 24 h (28.68 ± 0.63 $\mu\text{g/g}$; 20.38 ± 4.30 $\mu\text{g/g}$; 6.37 ± 1.17 $\mu\text{g/g}$) post-inoculación| y se detectó una segunda acumulación de *trans*-resveratrol a las 72 h (86.92 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$; 20.01 ± 0.04 $\mu\text{g/g}$; 16.91 ± 0.10 $\mu\text{g/g}$), superando las concentraciones de *Malbec*, que mostró *trans*-resveratrol y su glicosidado a las 48 h (71.82 ± 0.06 $\mu\text{g/g}$; 2.81 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$; 42.19 ± 0.19 $\mu\text{g/g}$). En los controles no se detectaron estos compuestos. La menor expresión de síntomas, muerte en un período de tiempo más extenso y mayores contenidos de resveratrol de *Vitis rupestris* respecto de *Malbec*, sugieren que la respuesta más rápida y más intensa le permite defenderse del hongo y confirma que *V. rupestris* es una variedad tolerante mientras que *Malbec* se comportó como susceptible.

Conocer la etiología de *Botryosphaeriaceae* spp. asociadas al cultivo de la vid y comprender los mecanismos de defensa de la vid, son esenciales para implementar un diagnóstico rápido de estos hongos de madera en vides adultas y la posibilidad de certificar plantas de vivero libres de éstos patógenos como también, establecer nuevas medidas de control eficiente de las enfermedades de madera.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN

1.1. La vid

Origen y taxonomía

El cultivo de la vid y el vino, están ligados a la historia de la humanidad formando parte de la cultura, el arte y la salud a lo largo de siglos. La vid es una planta trepadora de tronco leñoso, cuyo origen geográfico se sitúa entre Europa y Asia Central, en la región comprendida entre el centro del Himalaya y el Cáucaso. Los primeros indicios de la actividad vitícola en esta zona datan de 5.000 años antes de Cristo. A partir de aquí, el cultivo de la vid se extendió hacia occidente pasando por la Mesopotamia, Siria, Fenicia, Egipto y Grecia y de ahí al resto de Europa y del mundo. Inicialmente, fue introducida en América Central por los conquistadores españoles, a fines del siglo XV, de allí fue trasladada al norte y sur de América (Martínez, 2005).

Existen dos hipótesis sobre su introducción. Una primera hipótesis, supone que esta especie habría sido introducida por medio de plantas provenientes de las Islas Canarias, traídas en el año 1551 y cultivadas por Francisco de Caravantes y Hernando de Montenegro en el Valle de la Concepción (Perú). La segunda hipótesis, propone que se introdujo a través de semillas de pasas traídas por los colonizadores desde España para su alimentación, las cuales dieron origen a distintas variedades. De acuerdo a Hidalgo (2002) y Maurín Navarro (1967), esta hipótesis tendría mayor aceptación debido a que se sabe que la vitalidad de las plantas se compromete en largas travesías y la viabilidad de las semillas se prolonga cuando se conserva como pasas. Desde Perú, la vid llegó a Chile en manos de Francisco de Aguirre y desde la ciudad de La Serena habría entrado a la Provincia de Santiago del Estero, en Argentina por el Padre Juan Cidrón. A Mendoza, la vid llegó en el año 1561, mientras que a San Juan lo hizo un año después. Los resultados obtenidos por Agüero *et al.* (2007), Duran *et al.* (2011) y Milla Tapia *et al.* (2007) abonan la primera hipótesis, ya que la gran mayoría de las vides “criollas” que hoy están presentes en América, habrían sido derivadas del cruzamiento entre Moscatel de Alejandría y Criolla Chica, cultivares provenientes del Norte de África, Mediterráneo y España. Ese cruzamiento habría tenido lugar en el nuevo continente.

La vid es una planta angiosperma dicotiledónea, caducifolia perteneciente al orden *Rhamnales*, familia *Vitaceae*, género *Vitis vinifera* L. La familia *Vitaceae* posee 11 géneros y aproximadamente 450 especies. El género *Vitis* es el más importante y se divide en los subgéneros: *Muscadinia* (2n=40 cromosomas) representado por *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* y *V. popenoi* de las cuales, la primera de ellas citada, es de gran interés por su resistencia a plagas y enfermedades y *Euvitis* (2n=38), perteneciendo a éste último, la mayor parte de las vides cultivadas. El subgénero *Euvitis* se considera dividido, a su vez, en tres grandes grupos: a- las especies asiáticas orientales, de escasa relevancia en la viticultura actual; b- las especies americanas, de poca importancia en la

vinificación pero de gran potencial como portainjertos por su resistencia a filoxera como *V. rupestris*, *V. riparia* y *V. berlandieri*. Finalmente, c- las especies europeas, compuesto por *V. vinifera* L. dentro del cual se definen: *V. vinifera* ssp. *silvestris*, resistentes a enfermedades y de mayor rusticidad que las variedades cultivadas y *V. vinifera* ssp. *sativa* que representan, a nivel mundial, la totalidad de las vides cultivadas para la producción de uva, por sus excelentes cualidades; aunque es sensible a filoxera y otras (Martínez de Toda, 1991).

El cultivo de la vid se adapta muy bien a diferentes condiciones climáticas. Requiere relativamente, poca cantidad de agua. Hidalgo (2002) estima que se precisa entre 280 y 300 litros para formar un kilo de materia seca. Es un cultivo resistente a la sequía por su potente sistema radical y en general, se adapta muy bien a todo tipo de suelos, no obstante, la calidad del vino puede variar según el tipo de suelo y resulta un factor productivo determinante. Puede soportar hasta 40 °C de temperatura en la época estival y hasta 15 °C bajo cero durante el invierno. Sin embargo, es exigente en calor y muy sensible a las heladas tardías que ocurren durante o después del período de floración (Blanco, 2009).

Importancia del sector vitivinícola

La vitivinicultura manifestó un amplio y acelerado desarrollo en las provincias andinas, favorecida por óptimas condiciones climáticas y de suelo. En Mendoza y San Juan, dio lugar al desarrollo de una gran industria que transformó la aridez de esta zona, en verdes y extensos oasis. A principios del Siglo XVII, se contaba con una importante producción de vinos, lo que llevó a buscar nuevos mercados, tales como la Provincia de Buenos Aires.

A fines del Siglo XIX se comenzaron a emplear, en mayor escala, barriles de madera y a partir de 1853 la región vitivinícola más importante del país sufrió una transformación radical, debido a la organización constitucional, la llegada del ferrocarril y la creación de la Quinta Normal de Agricultura en Mendoza, que fue la primera Escuela de Agricultura de la República Argentina. El dictado de las leyes de aguas y tierras permitió el crecimiento de la colonización, con el importante aporte de los inmigrantes europeos que conocían muy bien las técnicas vitícolas y el cultivo de las variedades aptas para vinos finos, lo que dio lugar a innovaciones en las prácticas enológicas utilizadas en las bodegas hasta ese entonces (<http://www.inv.gov.ar/>, Instituto Nacional de Vitivinicultura).

La vid es el cultivo frutícola de mayor extensión en el mundo y la superficie mundial asignada en 2013, fue de 7.517 millones de hectáreas cultivadas en los distintos continentes. El sector vitivinícola internacional se ha caracterizado por la existencia de un grupo de países dominantes que concentran gran parte de la industria del vino mundial: España (1 millón de hectáreas), Francia (806.000 ha) e Italia (776.000 ha). Este grupo de países lidera la superficie cultivada de viñedos, la producción de uva, así como la elaboración de vinos.

Pero desde hace unas décadas, han aparecido en escena un conjunto de nuevos países emergentes: China (560.000 ha), Turquía (508.000 ha), Estados Unidos (407.000 ha), Portugal (240.000 ha), Irán (238.000 ha), Argentina (218.000 ha), Rumania (204.000 ha), Chile (200.000 ha), Australia (170.000 ha), Moldavia (143.000 ha), Sudáfrica (131.000 ha) cuyos rendimientos son elevados y poco a poco se han ido consolidando en este sector y se encuentran en expansión (Fernandez Portela, 2013; <http://www.oiv.int/oiv/info/espublicationsstatistiques>).

En 12 años, la superficie vitícola nacional se incrementó de 206.000 ha en 2002, a 226.388 ha en 2014. Mendoza es la provincia por excelencia para el cultivo de la vid, con 160.983 ha (71,11 % del total nacional), seguida por las Provincias de San Juan (21,7 %), La Rioja (3,29 %), Salta (1,35 %), Catamarca (1,2 %), Río Negro (0,74 %) y Neuquén (0,77 %).

Las condiciones naturales de Mendoza, como la altitud (entre 500 y 1.500 metros snm), aridez y suelos pedregosos, sol en abundancia y agua pura de deshielo de la Cordillera de los Andes, además de una marcada amplitud térmica entre el día y la noche, son el marco ideal para el cultivo de la vid. Actualmente, los oasis mendocinos destacados y compuestos por departamentos, son: la Zona alta del Río Mendoza, que abarca gran parte de las áreas cultivadas de los departamentos de Luján de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Las Heras. La segunda zona en importancia corresponde al Valle de Uco, que comprende San Carlos, Tunuyán y Tupungato. La zona norte, incluye Lavalle, Guaymallén y Las Heras. Finalmente, se destaca la zona del Este Mendocino (San Martín, Junín, Rivadavia, La Paz y Santa Rosa) y el Sur Mendocino (San Rafael y General Alvear) (Figura 1.1) (Fanzone, 2012).

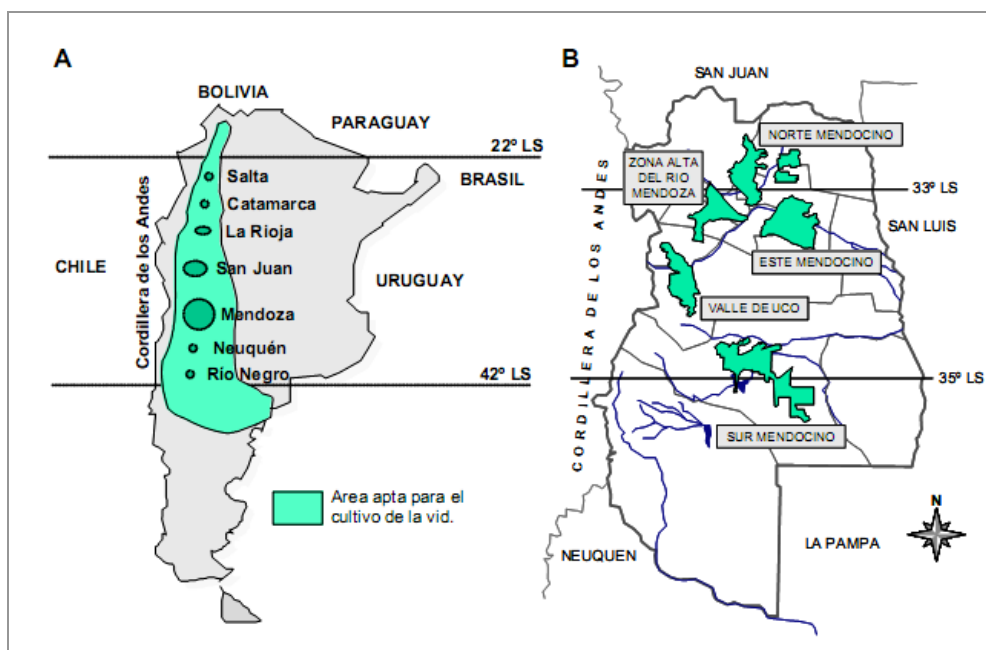


Figura 1.1. Regiones vitivinícolas de Argentina (A) y regiones vitivinícolas de la Provincia de Mendoza (B).

La actividad vitivinícola en Mendoza es de suma importancia y su presencia es integral. Esto se ve reflejado en los datos que muestran que la producción mendocina (18 millones de quintales) representa el 70 % de la producción nacional (26,3 millones de quintales en 2014), San Juan representa el 25 % (6,5 millones de quintales) y el 6,45 % restante se distribuye en las otras zonas. Además, los datos del año 2014 indican que el 98,39 % de superficie cultivada pertenece a variedades para vinificar, mientras que el 1,13 % y 0,34 % para consumo en fresco y pasas, respectivamente (<http://www.inv.gov.ar/>, Instituto Nacional de Vitivinicultura).

A nivel provincial, en las uvas de vinificar, los cultivares tintos constituyen el 57,51 % del total en 2014 (91.094 ha). Los más cultivados fueron: Malbec (36,56 %), Bonarda (17,76 %), Cabernet Sauvignon (13,33 %), Syrah (9,89 %) y Merlot (5,14 %) entre otras en menor proporción. Otra particularidad, fue la caída en la superficie de cultivares blancos (26.975 ha) que significaron un 17,03 % y rosadas de vinificar (40.325 ha) implantadas que representaron el 25,43 %. De los mismos, los cultivares que presentaron mayor superficie de cultivo en 2014, corresponden a Pedro Giménez (33,46 %), Chardonnay (19,54 %) y Torrontés Riojano (13,83 %) entre otras de menor proporción. Las clásicas variedades rosadas fueron Cereza (41,15 % del total de cv rosados de vinificar en 2014), Criolla (31,17 %) y Moscatel Rosado (16,89 %).

Características botánicas y reproducción de la vid

La vid, en estado espontáneo, es considerada una liana por su hábito de crecimiento. Posee una etapa de juvenilidad de 2 a 5 años cuando crece a partir de semilla, caracterizada por la ausencia de flores, la forma variable de las hojas y su disposición helicoidal sobre el tallo. La fase reproductiva está determinada por la capacidad de producir flores y zarcillos (sostén), lo que hace que la disposición de las hojas pase a ser alterna. En vides de producción comercial a través de la injertación de una *Vitis vinifera* (púa o variedad) sobre el sistema radical de un cultivar denominado patrón o portainjerto (*Vitis* spp. del grupo americano), la juvenilidad se ve suprimida y las plantas siguen el patrón de una planta adulta desde los primeros años de vida (Abreo-Gimenez, 2011).

Las vides procedentes de multiplicación agámica, poseen una raíz en cabellera con mayor concentración entre los 20 a 40 cm. de profundidad, la cual proporciona anclaje al suelo, sirve para la absorción de agua y elementos minerales, la producción de algunas hormonas de crecimiento y acumulación de sustancias de reserva (Martinez de Toda, 1991).

El tronco cumple con el sostén de la planta, almacenamiento de sustancias de reserva y con la conducción de la savia xilemática (principalmente en agua, elementos minerales, reguladores de crecimiento y otras sustancias que se hallan en disolución) como la savia floemática (agua, azúcares, fitorreguladores y minerales disueltos). Se encuentra revestido de una corteza llamada ritidoma que se desprende longitudinalmente, constituyendo una particularidad de la vid. Las plantas conducidas en espalderos suelen tener dos o tres brazos con los elementos portadores de la

madera de poda: sólo pitones en la poda corta (cordón bilateral) o pitones y cargadores en la poda mixta (Guyot). En el parral cuyano los brazos (dos, cuatro o seis) se disponen en forma de canasto. El resto de la planta de vid es lo que se renueva anualmente: elementos de poda (cargadores), sarmientos, yemas, hojas, racimos, zarcillos, etc.

Las yemas son las que aseguran la perennidad de la vid de un año a otro, indispensables para la multiplicación vegetativa. En el extremo se encuentra la yema terminal (ápice vegetativo) y en la axila del pecíolo de la hoja existen dos tipos de yemas: la yema latente, más prominente y que no se desarrolla el año de su formación y la yema pronta, más pequeña y que puede desarrollarse en el ciclo vegetativo originando un brote secundario (feminela). Finalmente en la base se encuentra un conjunto de yemas basales (casqueras) de las cuales la más destacada se denomina “bourillon”. Habitualmente en la primavera solo brota la yema primaria dando origen al pámpano. No obstante, si ocurriera un ataque de patógenos que provoque la muerte de este brote, la vegetación continuaría por las yemas secundarias (Martinez de Toda, 1991).

Los tallos, producen el crecimiento vegetativo y productivo anual de la vid. En el estado herbáceo se denomina pámpano y a partir del agostamiento, sarmiento. El tallo presenta características de colores, tamaño y velloidad que hace distintivo el carácter varietal. El proceso de pasaje de pámpano a sarmiento se caracteriza por el cambio de color del verde al castaño, la pérdida de humedad del 90 al 50 %, la detención del crecimiento, la senescencia del ápice vegetativo y la acumulación de almidón. Las hojas son los órganos que realizan las principales funciones: fotosíntesis, transpiración y respiración y muestran excelentes caracteres ampelográficos varietales. La vid presenta hojas caducas simples, foliadas, lobuladas y/o dentadas que se insertan en los nudos por medio de un pecíolo largo (Martinez de Toda, 1991). Se insertan en forma continua en cada nudo del tallo y en forma axilar a éstas, las yemas prontas y las yemas latentes.

Las flores agrupadas en inflorescencias en racimo (racimos de racimos), se insertan en la parte opuesta a la hoja en forma discontinua, se ubican en los nudos basales de los pámpanos y se encuentran preformadas en las yemas latentes de los sarmientos. Casi todas las variedades comercialmente importantes de *Vitis vinifera* son hermafroditas. Luego de dos o más nudos se encuentran dos nudos continuos con racimos y un nudo sin racimo y se repite la secuencia. Además, por tener el mismo origen ontogénico la secuencia continúa con los zarcillos. Esta secuencia es común a todas las vides europeas que pertenecen a la especie *Vitis vinifera* L.; en cambio en la vid americana *Vitis labrusca* los racimos y luego los zarcillos son continuos (Martinez de Toda, 1991).

Características anatómicas de la madera de la vid

El sistema vascular está formado por un anillo de haces líbero-leñosos separados por radios medulares. Dentro de cada haz, el floema (líber) se sitúa hacia el exterior y el xilema (leño) hacia el interior. Además, a través del mismo, se mueven los reguladores de crecimiento y estimulan cambios en el desarrollo de tejidos y órganos (Martinez de Toda, 1991).

En la vid, el xilema es más notable que el floema, se lignifica y forma anillos de crecimiento. Está constituido por los vasos, que son conductos formados por células muy diferenciadas, muertas a la madurez, por donde fluyen el agua y minerales; las fibras, células de pared gruesa que dan rigidez al tejido; y células parenquimáticas vivas, que almacenan metabolitos y carbohidratos. El floema se ubica por fuera del xilema y está compuesto por los tubos cribosos, las células acompañantes y fibras. Entre xilema y floema, se ubica el cámbium, tejido cuyas células se multiplican durante la producción y expansión de hojas, para formar nuevas células de xilema hacia el centro del cilindro y floema hacia afuera, incluyendo el parénquima radial que los comunica y en el que tienen lugar el movimiento lateral de compuestos orgánicos y acumulación de almidón.

Este parénquima, en la raíz, almacena almidón durante el otoño que luego es transformado en azúcares simples que serán transportados a la parte aérea, nutriendo los brotes de primavera. A partir del parénquima del año anterior no funcional, se desarrolla el felógeno que produce felodermis hacia adentro y súber hacia fuera y, en conjunto, se denominan peridermis. Su continua actividad, hace que se desprenda hacia fuera el floema y la peridermis que constituyen el ritidoma (Abreo Gimenez, 2011).

La vid, al comportarse como una liana, tiene recursos más limitados para el desarrollo de estructuras de soporte (tronco y ramas) que otros árboles frutales por lo que, para permitir un transporte eficiente del tejido conductor, compensa su menor diámetro de tallo con una relación superficie foliar/superficie de xilema alta y como consecuencia una adaptación de los tejidos xilemáticos para permitir un flujo de savia suficiente a un volumen de tejido conductor limitado, produciendo vasos de diámetros considerablemente grandes (200 μm a 300 μm) y largos. Esta adaptación implica también, una vulnerabilidad particular a ataque de hongos de madera (Abreo Gimenez, 2011; Pouzolet, 2012). La madera, resultante del crecimiento secundario, es el producto de una división y expansión celular, un engrosamiento de la pared, la muerte celular programada y la formación de duramen que constituye la última transformación de las células xilemáticas.

En un corte transversal de una cepa con crecimiento secundario, se distingue la albura externa, parte funcional del tronco, una zona intermedia y luego el duramen central en que los vasos del xilema se inactivan bloqueándose el transporte de agua debido a la producción de tilosis (invaginación a través de las punteaduras, de las células vecinas) (Pratt, 1974). Luego de ser producidas por el cámbium, las células xilemáticas mueren mientras que las células parenquimáticas permanecen funcionales por más tiempo. Cuando éstas últimas mueren, el xilema se denomina duramen (Plomion *et al.*, 2001).

La composición y estructura química de la madera es determinante del tipo de degradación producida. La pared celular de las células de la madera contiene celulosa, lignina y hemicelulosa dispuestas en una pared primaria externa y una secundaria multicapa más interna. La lignina es un

polímero de unidades de fenilpropano, derivado de ácidos hidroxicinámicos y su presencia otorga rigidez. La hemicelulosa es un polímero de monosacáridos como glucosa, manosa, xylosa, galactosa y ácido glucurónico. Estos componentes de las paredes celulares, son removidos diferencialmente, por los hongos de madera y se produce ablandamiento y separación celular y en función del componente que permanece inalterable determinan podredumbres castañas, blancas y blandas (Abreo Gimenez, 2011).

Existen trabajos que sugieren que la colonización de la madera por los hongos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. en vides maduras infectadas, así como plántulas inoculadas, está supeditada al transporte pasivo de propágulos en los vasos del xilema (Bruno y Sparapano, 2007a,b,c; Feliciano y Gubler, 2001).

Según Shigo (1985), las plantas leñosas limitan la propagación de patógenos de la madera aislando los tejidos sanos de los tejidos infectados. Se produce una compartimentalización que incluye tejidos nuevos formados por el cámbium vascular en respuesta a la infección, estableciendo una zona de barrera en la que se producen transformaciones anatómicas y fisiológicas del xilema (modificación de composición de las paredes celulares y modificación de radios celulares) a fin de limitar el desarrollo de los patógenos. Otra compartimentalización que se produce en la vid, en respuesta al ataque de un patógeno, es la oclusión de los vasos del xilema por la formación de tilosis, controlada por la vía de señalización del etileno (Sun *et al.*, 2007). Se produce la restricción del microorganismo en los vasos y limitación de la circulación sistémica de la toxina, además de la disminución de la conductancia hidráulica del xilema.

1.2. Aspectos fitosanitarios de la viticultura

El desarrollo de la vid, como el resto de los cultivos, se ve influenciado por distintos factores: variedad, condiciones climatológicas, características del suelo o labores agronómicas (tipo de poda, fertilización, riego). En su conjunto, estos factores condicionan también, el ataque de insectos y ácaros; virus, bacterias y hongos que constituyen plagas y enfermedades.

Dentro de las **plagas** de la vid, se encuentran la polilla del racimo (*Lobesia botrana*), cuyas larvas destruyen los botones florales y perforan las bayas facilitando la entrada de podredumbres (Gonzalez, 2010); la cochinilla harinosa (*Planococcus ficus*) que disminuye el vigor de las plantas y perjudica la calidad de los racimos (Becerra *et al.*, 2004) y la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) que causa agallas en raíz debilitando la cepa. Otras plagas comunes son las hormigas, el gusano de los brotes (*Eumorphia analis*), trips, arañuela roja (*Brevipalpus obovatus*) y eriófidos (*Eriophyes vitis*), la perla de la vid (*Margarodes vitis*), nematodos (*Meloidogyne* sp., *Xiphinema* sp.), mulita (*Naupactus xanthographus*), chinche verde (*Edessa meditabunda*), bicho del cesto (*Oiketicus*

moyanoi), chicharra de la vid (*Chonnosia cinnabarina*), cochinilla café (*Parthenolecanium persicae*), el pulgón de la vid (*Aphis illinoensis*) y el taladrillo (*Micrapate bruchi*).

Entre los agentes causantes de **enfermedades** en los viñedos argentinos, los virus son los que presentan menor incidencia. En Mendoza se citan “Grapevine virus A” (Vitivirus-Flexiviridae) y “Grapevine leafroll associated virus” 1, 2, 3, y 6 (Ampelovirus-Closteroviridae) causantes de enrollamiento del limbo y nervaduras, coloración roja con nervaduras verdes de hojas de variedades tintas y decoloración de bayas. También se citan “Grapevine Fanleaf virus”, “Raspberry ringspot virus” y “Arabic mosaic virus” (Comoviridae-Nepovirus) causando deformación de hojas (forma de abanico), entrenudos cortos, mosaicos y amarillamientos sistémicos. Los virus tipo “Grapevine fleck virus” (Maculavirus-Tymoviridae), provocan alteraciones cromáticas en las hojas y el virus “*Rupestris stem pitting associated virus*” (Foveavirus-Flexiviridae), produce disminución de vigor, retraso en brotación, engrosamiento del tronco por encima del injerto y hendiduras en la madera. Su control se basa en la eliminación de las cepas afectadas y la lucha contra los vectores de transmisión. Las bacterias, presentan una incidencia creciente en los últimos años y en Argentina, hasta el momento, se ha descrito la denominada “Agalla de corona” causada por especies de *Agrobacterium*, que se introducen en la planta y provocan tumores en tronco, raíz y sarmientos y producen decaimiento y muerte de vides (Escoriaza *et al.*, 2011).

Las enfermedades producidas por hongos, son las más frecuentes y afectan este cultivo con mayor alcance y magnitud. Aparte de las enfermedades de la madera, objeto de este trabajo y que serán tratadas en el punto 1.4 de esta introducción general, se conocen aquellas causadas por hongos que afectan follaje y frutos de las vides (Lucero *et al.*, 2009).

Se destacan: la peronóspora de la vid (*Plasmopara vitícola*), hongo parásito obligado que ataca particularmente hojas y racimos. En hojas jóvenes afectadas se presentan áreas indefinidas, brillante-translúcidas conocidas como “manchas de aceite”, típicas del haz de la hoja. Si las condiciones climáticas son adecuadas, en correspondencia, en la cara inferior de las hojas se origina una eflorescencia blanca algodonosa, correspondiente a los órganos reproductivos del patógeno. Las hojas adultas, muestran manchas poligonales, angulosas, aisladas o confluentes, pequeñas, cloróticas que luego se necrosan, delimitadas por las nervaduras. Produce marchitamiento de inflorescencias, oscurecimiento, curvado del raquis en forma de “S” y muerte.

El oídio de la vid, (fase sexual: *Erysiphe necator*, fase asexual: *Oidium tuckeri*), es un hongo que ataca hojas, brotes, sarmientos, inflorescencia y racimos. En hojas afectadas aparecen, tanto en el haz como el envés, manchas circulares y cloróticas, que se cubren de una eflorescencia blanco-grisácea correspondiente a los cuerpos reproductivos del hongo, la que también se encuentra en racimos y en los sarmientos, se producen lesiones color castaño-violáceo. Produce defoliación, mal agostado de los sarmientos y falta de reservas, debilitamiento general de la planta y predisposición al ataque de otros patógenos.

La podredumbre de racimos, es causada por un complejo: hongos (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* y *Mucor racemosus*) y en menor importancia bacterias, e insectos. Produce pérdida de flores, problemas de cuaje, lesiones castañas en raquis y secado del racimo. A partir del envero, se manifiesta en bayas con lesiones superficiales circulares, tomando coloración marrón grisácea en cultivares blancas y morada en tintas. Las bayas pierden consistencia, se agrietan, se cubren de eflorescencia gris y se desprenden con facilidad. Además de las pérdidas de cosecha, se producen importantes pérdidas de calidad enológica en uvas de vinificar, afectando la composición química de la baya y calidad de racimos para la uva en fresco. También afecta racimos, la llamada Podredumbre ácida, producida principalmente por levaduras y bacterias acéticas (géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*). Se caracteriza por una fuerte oxidación de la cutícula u hollejo, ablandamiento y maceración de la pulpa, pérdida de mosto y vaciamiento de la baya, acompañado con un fuerte olor a ácido acético y presencia de larvas y adultos de la mosquita del vinagre (*Drosophila melanogaster*), las que diseminan los agentes patógenos de la enfermedad.

1.3. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Panorama mundial.

Los decaimientos de la vid en las distintas regiones vitícolas del mundo son causados por un elevado número de especies fúngicas que han ido aumentando con el avance de las investigaciones. Estos hongos se agrupan en una serie de enfermedades conocidas a nivel internacional como: **Enfermedad de Petri** (*Phaeomoniella chlamydospora* y especies de *Phaeoacremonium*); **Esca** (*Phaeomoniella chlamydospora*; *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeoacremonium* spp.; *Fomitiporia mediterranea* (= *Fomitiporia punctata* = *Phellinus punctatus*); *Stereum hirsutum*; *Eutypa lata* y especies de los géneros *Fomitiporella*, *Inonotus*, *Inocutis*, *Phellinus*). Diferentes especies de la familia *Botryosphaeriaceae* producen enfermedades como **Brazo negro muerto** (*Diplodia seriata*. teleomorfo *Botryosphaeria obtusa*, *Neofusicoccum parvum* teleomorfo *Botryosphaeria parva* y *Diplodia mutila* teleomorfo *B. stevensii*); **decaimientos por *Neofusicoccum*** (*N. parvum* teleomorfo *B. parva*, *Botryosphaeria dothidea*); ***Botryosphaeria* canker** (*Botryosphaeriaceae* spp.) y ***Diplodia* Cane Dieback** (*Botryosphaeria rhodina*). También, el denominado **Pie negro** (*Cylindrocarpon* spp.), **Eutipiosis** (*Eutypa lata*); **Fusariosis** (*Fusarium oxysporum*) y **Verticilosis** (*Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*).

Los agentes patógenos asociados a las diferentes enfermedades de madera, pueden coexistir en una misma planta y viñedo y sus combinaciones al igual que sus interacciones, generan en la planta una sintomatología múltiple, compleja y a veces confusa. Incluso algunas pueden ser precursoras de otras (Larignon y Dubos, 1997; Larignon *et al.*, 2009, 2011; Mugnai *et al.*, 1999; Phillips, 2002). Penetran a la planta a través de las heridas y afectan los tejidos de conducción

limitando severamente el movimiento de agua y nutrientes entre la raíz y la canopia. En la vid, provocan diferentes sintomatologías que concluyen en una pérdida de vigor de la planta y el decaimiento parcial o total de la planta comprometiendo la longevidad y perennidad de las cepas e interfiriendo en la productividad y en la calidad de los vinos. Tienen períodos de incubación muy largos y su evolución es lenta. Su aumento se atribuye a la prohibición del arsenito sódico en Europa, nuevas técnicas de producción del material vegetal en vivero y la introducción de nuevos cultivares. Esta situación ha provocado un renovado interés en el estudio de estas enfermedades, impulsando el desarrollo de nuevas líneas de investigación en todo el mundo (García-Jiménez, 2007, 2010; Mugnai *et al.*, 1999).

La **Esca (black measles)** afecta severamente zonas vitícolas de Algeria, Alemania, Australia, Bulgaria, Canadá, Croacia, España, Estados Unidos, Francia, Grecia, Hungría, Irán, Italia, Portugal, Rumania, Serbia, Eslovaquia, Turquía y Ucrania. Además, ha sido observada en el hemisferio Sur sólo en Africa del Sur y Australia. Es una de las enfermedades de la vid más antiguas que se conocen y se considera endémica en casi todas las zonas vitivinícolas mundiales afectando principalmente a cepas de más de 25 años (Figura 1.2).

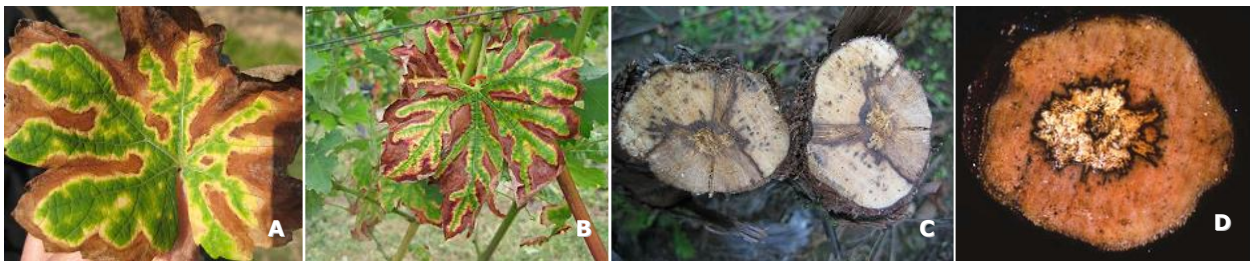


Figura 1.2. Síntomas característicos del complejo Esca. A y B: decoloraciones internervales en hoja de un cultivar blanco (A) y de un cultivar tinto (B). C y D: cortes transversales de la madera con necrosis blanca esponjosa (Bruez, 2013; Larignon, 2012).

Aún no se ha esclarecido si es un complejo de enfermedades o una misma enfermedad que adquiere distintas sintomatologías en función del hongo predominante o la edad de la planta. Afecta tronco, brazos, brotes, hojas y bayas. En hojas se manifiestan manchas internervales amarillentas en las variedades blancas y rojas en las variedades tintas que finalmente se necrosan, coalescen y se extienden de forma particular entre las nervaduras, en los márgenes de las hojas, dejando una estrecha franja de tejido verde. Las hojas se secan gradualmente y caen prematuramente. La presencia sistemática de una fina franja amarilla delimitando la zona necrótica de la aún verde, permite diferenciar los síntomas de esca, de los de brazo negro muerto. Este síndrome también presenta una forma apopléctica que seca la planta en forma súbita en pleno verano luego de un marchitamiento de hojas desde los extremos hacia el interior de la planta. Cuando se forman, los racimos se secan antes de tiempo y los años de fuerte expresión de síntomas, la producción se ve seriamente comprometida. Los síntomas sobre brazos y troncos en cortes longitudinales o transversales de la madera muestran dos necrosis diferentes. La primera, una zona clara de posición

central y consistencia dura en sus inicios para luego tornarse esponjosa, separada de otra zona dura rosada, por un cordón de color oscuro llamado línea negra (black line). La segunda necrosis, es sectorial, y presenta una zona marrón dura que delimita una zona clara desmenuzable. Los síntomas en baya aparecen como puntos violáceos sobre la cutícula y se han descrito en diferentes países: Sudáfrica, Australia, Italia, Estados Unidos, Francia (Alsacia) y Suiza (Larignon, 2012).

La **Enfermedad de Petri (grapevine decline, young esca, Petri disease, black goo)** se observa en viñedos jóvenes y causa importantes pérdidas económicas en Sudáfrica, Australia, Chile, España, Estados Unidos, Grecia, Hungría, Irán, Italia, Nueva Zelanda, Perú, Portugal, Eslovaquia, y Uruguay (Larignon, 2012). Se considera precursora de la Esca y los síntomas característicos son: retardo de crecimiento, entrenudos cortos y clorosis de hojas causando decaimiento progresivo hasta la muerte. En madera, se producen manchas negras en cortes transversales y estrías marrones en cortes longitudinales. Se perciben además, exudados gomosos de color negro característico y bloqueos de vasos xilemáticos (Figura 1.3).



Figura 1.3. Sintomatología de la enfermedad de Petri. A: cepas jóvenes con brotación deficiente y clorosis en hojas. B: Sección transversal de tallo con vasos oscurecidos alrededor de la médula. C: corte transversal con exudados gomosos oscuros en los vasos (Gramaje y Armengol, 2011; Larignon, 2012).

La expresión de síntomas señalada para especies de *Botryosphaeriaceae*, difiere según la zona vitícola productora y los distintos cultivares recibiendo entonces, diferentes denominaciones. El **brazo negro muerto (Black dead arm)** afecta viñedos adultos, en zonas de clima mediterráneo y templado mostrando reducción de vigor y muerte progresiva de plantas. Esta enfermedad se describe en Chile, España, Francia, Hungría, Italia, Líbano, Portugal, Canadá, Brasil y Egipto (Césari, 2004; Larignon, 2012). Los síntomas se confunden fácilmente con los de la Esca y aparecen en las hojas basales de la planta. Cuando la enfermedad evoluciona de forma lenta, se caracteriza por manchas necróticas internervales y en bordes de las hojas. En las variedades tintas, los síntomas se diferencian de los de la Esca por la ausencia de coloración amarilla que delimita la zona necrosada de las zonas aun verdes de las nervaduras y un borde más marrón violáceo oscuro. En su forma severa se observa una pérdida precoz de hojas y la planta se seca total o parcialmente. En cortes transversales, se observan vasos obstruidos y necrosis marrón características (Figura 1.4).



Figura 1.4. Síntomas de Brazo negro muerto. A: detalle de hojas con las decoloraciones características. B y C: cortes transversales en los que se observa la necrosis sectorial característica. D: cepa descortezada en la que se observa la necrosis longitudinal (Bruez, 2013; Larignon, 2012).

El síndrome *Diplodia cane dieback*, en su forma lenta, se caracteriza por brazos de poco vigor con hojas cloróticas más pequeñas que las sanas. En la forma rápida, se observa necrosis de yemas, reducción de crecimiento y muerte. Los **cancros asociados a *Botryosphaeria*** (*Botryosphaeria canker*), fueron observados en Sudáfrica, Australia, Brasil, Canadá, California, Chile, Egipto, España, Italia, México, Nueva Zelanda y Venezuela. Las plantas afectadas presentan la característica muerte de brazos y cordones así como ausencia de brotación o brotes débiles en cordones todavía vivos. Los **decaimientos por *Neofusicoccum*** actualmente se describen en Francia y Portugal. Se caracterizan por decoloraciones entre las nervaduras principales de las hojas, defoliación parcial o total y muerte de injertos. En los troncos se observan necrosis sectoriales castaño grisáceas de consistencia dura y puntuaciones negras que longitudinalmente coinciden con bandas castañas y estrías oscuras, respectivamente (Dubos, 2002; Larignon, 2012).

La **Eutipiosis** ha sido estudiada en Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Algeria, Alemania, Austria, Brasil, Bulgaria, Canadá, China, Croacia, España, Francia, Grecia, Suiza, Hungría, Italia, Jordania, Líbano, México, Nueva Zelanda, Portugal, Rumania, Serbia, Eslovaquia, Siria, Turquía, Uruguay y Venezuela. Su distribución a nivel mundial está muy generalizada, causando pérdidas de consideración. Está afectada principalmente por la incidencia de las lluvias, aparece abundantemente cuando la media anual excede los 600 mm y está ausente en zonas semidesérticas (< 250 mm de lluvia anual) (Dubos, 2002; Larignon, 2012; Pearson y Goheen, 2001). Produce brotes de crecimiento débil, hojas pequeñas y cloróticas. En corte transversal de la madera se observa una necrosis sectorial en forma de V (Figura 1.5).

El **pie negro**, afecta a plantas jóvenes (2 a 10 años) de Sudáfrica, Australia, Brasil, Canadá, Chile, España, Estados Unidos, Francia, Irán, Italia, Líbano, Portugal y Uruguay (Larignon, 2012). Las plantas enfermas muestran brotaciones débiles, cloróticas y terminan secándose bruscamente. A nivel de raíz, es común observar dos niveles radicales, uno superficial con aspecto normal y un segundo nivel con raíces necrosadas y oscurecidas. Al quitar la corteza del tallo, se observa una franja marrón longitudinal que llega hasta la altura de injerto y coincide con necrosis observadas claramente, en corte transversal (Figura 1.6).

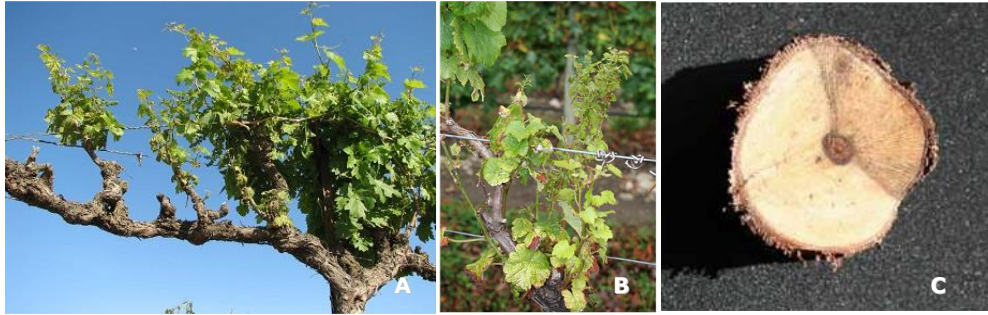


Figura 1.5. Síntomas característicos de la *Eutipiosis*. A y B: Brotes débiles. C: corte transversal de la madera con necrosis característica (Andolfi *et al.* 2009; Bruez, 2013).

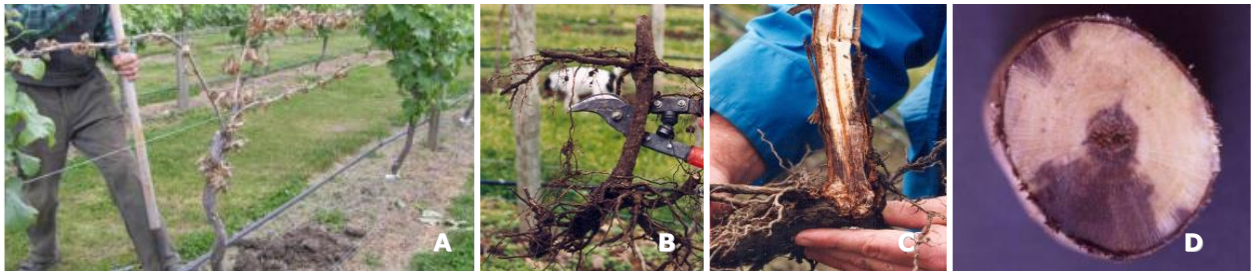


Figura 1.6. Cepa joven afectada por Pie negro. A: síntomas foliares de Pie negro. B: detalle de las raíces en dos planos. C: corte longitudinal con vasos necrosados. D: corte transversal con necrosis de la madera (Probst, 2011; Larignon, 2012).

La **fusariosis** es citada en Brasil, Egipto, Italia y Australia causando reducción de crecimiento de plantas jóvenes, necrosis de raíces y oscurecimiento de vasos del xilema del tronco en corte transversal y bandas castañas en corte longitudinal. También, la **verticilosis**, estudiada en Alemania, Austria, Chile, China, Estados Unidos, Grecia, Italia, Nueva Zelanda, Turquía y Francia es una enfermedad de la madera de viñedos jóvenes. Presenta una forma lenta, caracterizada por clorosis o enrojecimiento del limbo, según la variedad, presencia de sectores necróticos, secado de inflorescencias y racimos y necrosis de raíces. Y una forma severa, que concluye en la muerte repentina de la planta. En la madera, los síntomas se traducen en necrosis oscuras características (Larignon, 2012) (Figura 1.7).

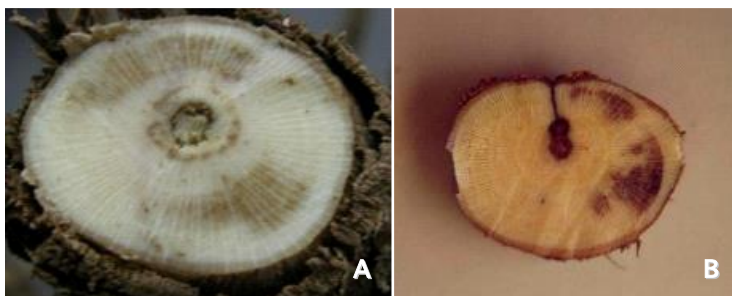


Figura 1.7. Síntomas en corte transversal de troncos de vides jóvenes. A: detalle de necrosis producida por *Verticilosis*. B: necrosis característica de *Fusariosis*. D: cepa descortezada en la que se observa la necrosis longitudinal (Bruez, 2013; Larignon, 2012).

1.4. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid en Argentina.

Las denominadas “**hoja de malvón o brazo muerto**” y “**decaimiento de vides jóvenes**” (Gatica *et al.*, 2000a, 2001, 2007) son enfermedades de madera de gran importancia en viñedos argentinos. La primera, se observó desde principios de siglo en los viñedos de Mendoza y San Juan (Vitoria y Alcalde, 1949). A partir de la década de 1990, coincidiendo con el establecimiento de numerosas plantaciones nuevas, se comenzó a detectar en diferentes regiones, un aumento en el decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes desde el primer año de la plantación. Ambas enfermedades, se encuentran diseminadas en distintas zonas productoras de Mendoza, San Juan, Alto Valle, La Rioja, Catamarca y Salta, en uvas de vinificar, de mesa y pasas causando daños significativos. Gatica *et al.*, (1997a,b), estudiaron la relación entre distintos factores de cultivo, incidencia de la enfermedad y rendimientos con la severidad de la hoja de malvón en 80 viñedos de la zona norte y centro de la provincia de Mendoza. El 46 % de las propiedades encuestadas presentaron una incidencia de la enfermedad entre 1 y 10 % y el 30 % de ellas, una incidencia entre 11 y 20 %. Durante 1999, el 65,1 % del total de las pérdidas económicas estimadas en un parral del cultivar *Chenin*, correspondieron a plantas afectadas por esta enfermedad (Gatica *et al.*, 1999). Estimaciones de daños realizadas con posterioridad en viñedos de Luján de Cuyo, Lavalle y Tupungato demostraron que su incidencia osciló entre 6 y 33 % (Césari *et al.*, 2002; Gatica *et al.*, 2000b). La manifestación de la enfermedad en una parcela del cv. *Chenin* varió desde 13,2 % de plantas afectadas en 1999 a 30,8 % en el año 2003 (Gatica, comunicación personal). Estos estudios demostraron la importancia que esta enfermedad tiene en la región.

La hoja de malvón comienza a manifestarse en uno de los brazos de la planta, afectando sarmientos, hojas y racimos. Las hojas presentan menor tamaño, se tornan cloróticas y con los bordes enrollados hacia abajo, tomando la apariencia de una hoja de “geranio”, de donde toma el nombre la enfermedad. Los sarmientos o brotes del año, presentan menor crecimiento y entrenudos cortos. Los racimos son más pequeños, laxos y con granos de tamaño no uniforme. A medida que la enfermedad progresa, se extiende a otros brazos, la planta se vuelve improductiva y finalmente muere (Figuras 1.8 y 1.9).

En el corte transversal del tronco, se pueden observar necrosis de distintas coloraciones y consistencias que indican al avance de la enfermedad (Gatica *et al.*, 2001) (Figura 1.10). Asimismo, se ha detectado en el tronco de algunas plantas, fructificaciones de color castaño claro correspondientes a basidiocarpos del hongo *Inocutis jamaicensis* (Gatica *et al.*, 2004). Esta enfermedad se ha comparado con la esca, citándose similitudes en los síntomas de madera y diferencias en los síntomas foliares y en la microflora fúngica asociados a ella (Gatica *et al.*, 2000a). Finalmente, la hoja de malvón produce heterogeneidad, reducción de la longevidad y productividad de los viñedos. Además, la vinificación de uvas enfermas reveló que el efecto de esta enfermedad en la calidad de los vinos no siempre es positiva (Casassa *et al.*, 2010).

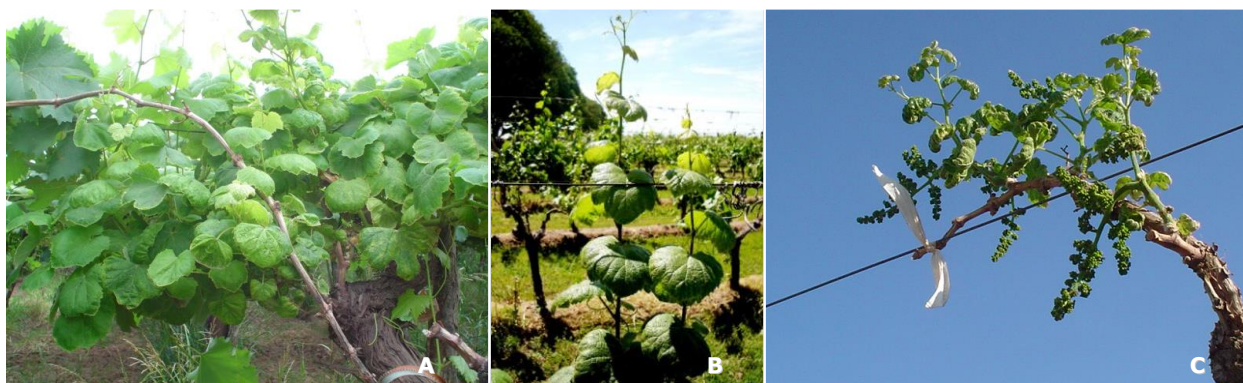


Figura 1.8. Brotes y hojas del cv. Chenin con síntomas típicos de hoja de malvón. A: síntomas en hojas en el cv. Torrontés riojano. B: detalle de enrollamiento de hoja. C: brotes débiles, de entrenudos cortos y hojas cloróticas.



Figura 1.9. A: muerte parcial de brazos en el cv. Chenin. B: presencia de cuerpos fructíferos del basidiomicete *Inocutis jamaicensis* en tronco del cv. Chenin.

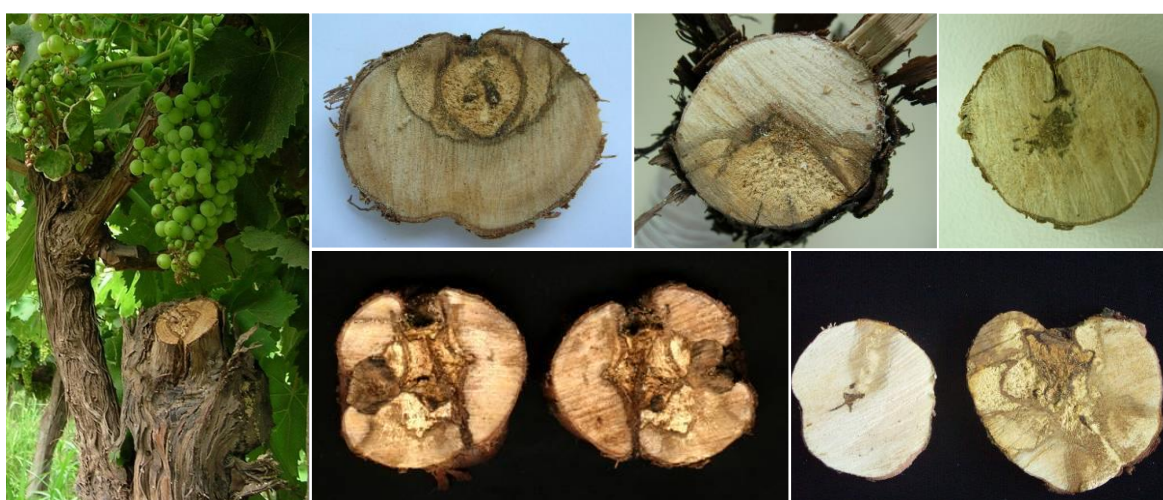


Figura 1.10. Síntomas de necrosis en madera, en cortes transversales de tallos de vides afectadas con Hoja de malvón.

Las plantas jóvenes, manifiestan crecimiento débil y lento. Producen pámpanos con entrenudos cortos y hojas pequeñas y de aspecto clorótico, además de menor calibre de tallo. Finalmente, lleva a la muerte de la planta (Figura 11). En cortes transversales de la madera, se observan necrosis sectoriales de color oscuro y consistencia dura que comienzan en la base de las ramas afectadas y se extienden hacia la zona del injerto. Estas necrosis están generalmente asociadas a un corte de poda u otro tipo de herida. Los vasos xilemáticos se necrosan y en cortes transversales del tallo se ven como puntos negros, más o menos agrupados, que rodean la médula (Figura 12). En cortes longitudinales, se muestran como estrías oscuras. Estos síntomas, si bien pueden aparecer a lo largo de toda la madera del portainjerto, del injerto, e incluso por encima de él, pero en general son más acentuados en la zona basal del portainjerto.

Respecto de la etiología, investigaciones efectuadas en Mendoza, señalan que los hongos *Inocutis jamaicensis* (Murrill) Gottlieb, J.E. Wright & Moncalvo, *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingfield & L. Mugnai) Crous & W. Gams, *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M. J. Wingfield & L. Mugnai, *Phaeoacremonium parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang), *Botryodiplodia theobromae* Pat. y *Botryosphaeria* spp., están frecuentemente asociados a la enfermedad (Césari y Gatica, 2001; Dupont *et al.*, 2002; Gatica *et al.*, 2000a, 2001, 2004).

En plantas mayores de 11 años con necrosis en madera, el porcentaje de aislamiento de *Inocutis jamaicensis* predominó sobre los porcentajes de aislamiento de especies de *Botryosphaeria*, *Phaeoacremonium* y *Phaeoconiella chlamydospora*. En plantas jóvenes (<11 años) con decaimiento, se aislaron con mayor frecuencia especies de *Botryosphaeria*, seguida de especies de *Phaeoacremonium*. Estudios recientes demostraron la patogenicidad de *I. jamaicensis*, *Phaeoacremonium* spp. y *Botryosphaeria rhodina*. Vides maduras inoculadas, manifestaron luego de un período de incubación de seis años, los síntomas típicos de la hoja de malvón (Gatica *et al.*, 2004).



Figura 1.11. Cepa joven del cv. Chardonnay afectada con decaimiento, con brotación débil A: detalle de síntoma en hoja en cv Malbec de < 10 años.



Figura 1.12. Cortes transversales de tallos de vides jóvenes con decaimiento.

Epidemiología de hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes

Respecto de la susceptibilidad varietal, no se ha observado asociación entre diferentes cultivares de *Vitis vinifera* e incidencia de la enfermedad. Desde el punto de vista epidemiológico, se determinó que la distribución espacial a campo de la enfermedad es al azar; lo cual implica que el riesgo de contagio entre plantas contiguas no es significativo (Césari y Gatica, 2001; Césari *et al.*, 2002).

La transmisión se realiza por madera infectada (restos de poda) y herramientas de poda (serrucho), habiéndose comprobado que también tiene una diseminación aérea, aunque al producirse ésta en el periodo vegetativo y no durante el invierno que es cuando hay heridas de poda, desde un punto de vista práctico, este tipo de diseminación aérea parece tener menor importancia. Recientemente, se demostró que arañas, la hormiga *Crematogaster peringueyi* y el miriápodo *Ommattoiulus moreleti* son efectivos transportadores de hongos (Moyo *et al.*, 2014). Los síntomas externos presentan una gran versatilidad, dependiendo también de factores como condiciones climáticas y edafológicas. Se ha demostrado que las plantas afectadas pueden desarrollar síntomas durante un ciclo vegetativo y no mostrarlos al año siguiente (Di Marco *et al.*, 2000).

Aunque existen diferencias marcadas entre los géneros de patógenos considerados, en general su ciclo de vida es muy similar y puede ser resumido en las siguientes fases: la invasión extravascular, que determina el éxito o no en alcanzar el sistema vascular; la posterior invasión vascular, que determina el éxito o no en colonizar el sistema vascular; la colonización extravascular; la destrucción de los tejidos del huésped y producción de estructuras de

supervivencia; la liberación de las estructuras de supervivencia en restos de madera, la producción de nuevas estructuras de supervivencia a través de actividades saprofitas o por colonización de tejidos corticales. La colonización vascular suele estar relacionada con la virulencia del patógeno y su especialización vascular es probablemente el resultado de su incapacidad de evadir las defensas de las células del parénquima anexo al xilema en la raíz y tallo. Un gran número de investigaciones concluyen que la oclusión vascular es el principal factor responsable de la marchitez, asociado a numerosos factores en los que intervienen la acción directa del patógeno, su interacción con la planta y la respuesta de ésta (Sun *et al.*, 2011).

El incremento observado en la incidencia de enfermedades fúngicas de la madera en plantas jóvenes y asimismo, durante el proceso de producción de plantas en los viveros, puede relacionarse, según algunos investigadores, con varios factores. En primer lugar, con una reducción en el cuidado sanitario del material de propagación, con lo cual se ha visto afectada la calidad de las plantas de vivero. En segundo lugar, con los cambios ocurridos en las prácticas culturales y manejo del viñedo, siendo quizás uno de las más relevantes la escasa protección de las heridas de poda en el campo que pueden favorecer la entrada de diferentes patógenos y finalmente, la falta de productos fungicidas efectivos para su control.

Estrategias de control de enfermedades de madera de la vid

En cuanto al control, actualmente no se dispone de ningún método de lucha eficaz contra los decaimientos de la madera, y es muy difícil la erradicación de estos hongos cuando ya infectaron la planta. Se han llevado a cabo investigaciones de la aplicación de fungicidas, por inyección directa al tronco, resultando inefectivas (Darrieutort y Lecomte, 2007) o de impacto muy limitado (Dula *et al.*, 2007).

El tratamiento de las heridas de poda con fungicidas tiene como objetivo inhibir el crecimiento micelial por sí mismo, como también, crear una barrera física para prevenir las infecciones. Se han evaluado una variedad de fungicidas y las pruebas con benzimidazoles resultaron las más efectivas, aunque los resultados no se aplican al conjunto de hongos asociados a estas enfermedades (Gubler *et al.*, 2005; Hallen *et al.*, 2010; Sosnowski *et al.*, 2009). La tendencia actual es la reducción de productos químicos debido al menor número y eficacia de las nuevas materias activas, a problemas de contaminación y el perjuicio que ocasionan sobre la vida humana y otras especies, a la aparición de resistencias a productos fitosanitarios con mayor frecuencia y al incremento de la producción ecológica. Las investigaciones en el campo del control biológico, elicitores de defensa o inoculación de hongos micorrizicos arbusculares, se proponen como buenas alternativas y son tema de diferentes líneas de investigación. Las medidas profilácticas y las buenas prácticas culturales se perfilan como la mejor estrategia para disminuir los decaimientos de la vid (Blanco, 2012).

Algunos agentes biológicos: *Trichoderma harzianum* (John *et al.*, 2008) y *Bacillus subtilis* (Ferreira *et al.*, 1999), han mostrado potencial eficiencia como tratamientos preventivos de heridas de poda para patógenos de madera (*Eutypa lata*).

Existen estrategias de cultivo efectivas para reducir la diseminación de la enfermedad. Se debe realizar un seguimiento individual de los síntomas externos, identificar cepas y estudiar su evolución. Las heridas de poda, constituyen una vía de entrada de los hongos responsables del decaimiento, por lo que, para reducir la susceptibilidad de las heridas se debe: reducir la sección del corte de poda, no incurrir en podas de renovación excesivas, no podar cuando llueve, preferir una prepoda larga y una poda definitiva tardía, remover y quemar restos de poda, vides enfermas y madera afectada de hospederos alternativos, cubrir las heridas con un aislante (látex) con fungicida y desinfectar herramientas de poda. La poda en verde también reduce heridas mayores durante la poda en invierno. Se deben podar plantas con síntomas externos en forma separada. Es importante el saneamiento de las plantas durante la etapa de multiplicación en vivero utilizando medidas de control químico o físico. Para reponer plantas por amugronamiento, esta práctica se debe efectuar a partir de plantas sanas o bordes bajos del tronco y separándolas lo antes posible, realizando un cuidado óptimo de la nueva cepa hasta su desarrollo. En caso de recepado, deben efectuarse cortes hasta observar madera sin síntomas y en caso de injertación, se recomiendan realizar injertos de hendidura (Blanco, 2012; Césari *et al.*, 2006; Escoriaza *et al.*, 2005, 2008; Gatica *et al.*, 2007; Sosnowski *et al.*, 2008). El aumento de severidad de las enfermedades de madera, también es favorecido por condiciones de reducción de vigor de las plantas, heladas, altas temperaturas en verano, pobre nutrición y podas mal conducidas (Larignon y Dubos, 2000; van Niekerk *et al.*, 2006).

1.5. Mecanismo de defensa de las plantas

Para que se desarrolle una enfermedad, es necesaria la presencia de un patógeno virulento, una planta susceptible y un ambiente favorable. Uno de los primeros eventos que ocurren durante el contacto planta-patógeno, es el reconocimiento de uno por el otro. El fracaso de una infección puede ser atribuido, en parte, al reconocimiento del posible patógeno por la planta y la activación de mecanismos de defensa contra ese invasor (Agrios, 1996). Teniendo en cuenta su estilo de vida, los microorganismos patógenos se pueden dividir en necrótrofos y biótrosos (Berger *et al.*, 2007). Los necrótrofos son aquellos microorganismos que destruyen los tejidos de la planta huésped y asimilan el contenido celular de manera saprófita. La mayoría de microorganismos han evolucionado para convivir con la planta huésped, se denominan biótrosos, y requieren del huésped vivo para completar su ciclo de vida. Además, existen patógenos vegetales que pueden mostrar ambos estilos de vida, según la etapa de su ciclo de vida, y se denominan hemibiótrosos.

Las plantas han desarrollado estrategias para protegerse de estos patógenos: defensas pasivas o preexistentes y defensas activas o inducibles, que se producen como respuesta al ataque del microorganismo. Las **defensas pasivas** de tipo estructural, incluyen barreras estructurales que suponen un primer nivel de protección pre-invasivo, para prevenir o atenuar la invasión de los patógenos (capas gruesas de cutícula, tricomas, deposición de ceras, pectinas, cutina, suberina, lignina, peroxidasas, fenoles, fibras de celulosa, calosa y proteínas de la pared celular) (Bessire *et al.*, 2007; Bishop, 2002; Grobkinsky *et al.*, 2012; Punja, 2001; Vitalini, 2012). Las defensas pasivas de tipo químico, son compuestos preformados y de carácter constitutivo, que limitan el establecimiento del patógeno y su diseminación, conocidos como **fitoanticipinas** o metabolitos pre-infección (Harborne, 1999). Son compuestos de bajo peso molecular presentes en las plantas antes del ataque de microorganismos en suficiente concentración para inhibir al patógeno, o son producidas después de la infección a partir únicamente de constituyentes preexistentes (Van Etten *et al.*, 1994). Se citan un gran número de estos compuestos, incluyendo fenoles y glicosinatos fenólicos, lactosas insaturadas, compuestos azufrados, saponinas, glicósidos cianogénicos y resorcinoles (Reche *et al.*, 2009). Los taninos encontrados dentro de la madera, son un ejemplo de compuestos que presentan esta propiedad (Bellow, 2012; Vitalini, 2012).

Las plantas poseen además, un amplio espectro de **mecanismos de defensa activa o inducibles**, que a diferencia de la respuesta pasiva, conllevan cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. En consecuencia, para que ocurra la inducción de la defensa, se requiere la mediación de un sistema de reconocimiento específico planta-patógeno, el cual ocurre a través de la interacción de agentes elicitors del patógeno o del vegetal generados por la acción del patógeno, y de receptores proteicos presentes en la membrana celular de la planta (Montesano *et al.*, 2003; Veronesse *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). La activación de estos receptores emite una señal primaria que desencadena una cascada de señales intracelulares, sincronizadas, activación de genes de defensa y producción de reacciones defensivas características del vegetal (Kumar *et al.*, 2008; Thomma *et al.*, 1998).

Incluyen respuestas estructurales primarias de fortificación de la pared celular de (glicanos, pectinas, cutina, suberina, lignina, peroxidasas, fenoles, fibras de celulosa), la síntesis de calosa y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), reacciones primarias necesarias para la activación de la respuesta de hipersensibilidad (HR). La HR está asociada a la muerte celular programada y a la síntesis de AS clave para la inducción de respuestas secundarias como acumulación de compuestos con actividad microbiana (fitoalexinas) y las proteínas PR (del inglés: “pathogenesis-related protein”) (Vitalini, 2012).

Se ha observado, que cuando las plantas sobreviven a una infección, desarrollan a largo plazo y de manera sistémica en partes alejadas de donde se produjo la infección, una mayor resistencia a un nuevo ataque, para proteger los tejidos de la planta que no han sido dañados. Este

fenómeno se conoce como resistencia inducida y dependiendo del tipo de estímulo que actúa como inductor, y de los mecanismos responsables de la resistencia alcanzada, se conocen distintos tipos de resistencia inducidas, una de ellas, es la denominada **resistencia sistémica adquirida (SAR)** (del inglés “Systemic Acquired Resistance”), inducida por patógenos biotróficos, por tratamientos con benzotiadiazol (BTH) y con un análogo fosforado del ácido salicílico (AS). Este tipo de resistencia se desarrolla local y sistemáticamente y a largo plazo, en respuesta al patógeno y es capaz de proteger a la planta frente a un amplio rango de patógenos. Deriva de la interacción del huésped con un patógeno avirulento o de baja virulencia, que le confiere mayor resistencia al ataque posterior de patógenos más virulentos (Anderson *et al.*, 2006; Hammerschmidt y Kagan, 2001; Kachroo *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2009; Spencer *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2009). La activación de la SAR, puede producirse tras la activación de las respuestas ETI o PTI y se caracteriza por la activación de un conjunto de genes PR (del inglés “pathogenesis related”) que codifican para proteínas con actividad microbiana, asimismo, se asocia con niveles elevados de la hormona AS en el lugar de la infección y también de manera sistémica en partes distales de la planta (Durrant y Dong, 2004).

Por otro lado, se ha observado la inducción de una inmunidad similar a la inducida por los patógenos avirulentos, producida por microorganismos beneficiosos del suelo como los hongos micorrízicos arbusculares, las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Van Loon *et al.*, 1999) y hongos beneficiosos pertenecientes al género *Trichoderma* (Van der Ent *et al.*, 2009). Esta respuesta se denomina **resistencia sistémica inducida (ISR)** (del inglés “Induced Systemic Resistance”), y al igual que la SAR es una resistencia sistémica, a largo plazo y de amplio espectro. A diferencia de la SAR, la activación de la ISR es independiente de la hormona SA, y no conlleva cambios importantes en la activación de genes PR. Sin embargo, su activación está regulada por las hormonas etileno (ET) y ácido jasmónico (AJ) (Kuc, 2000). Este tipo de defensa se asocia a un aumento de la capacidad de la planta para activar sus mecanismos de defensa tras el ataque de un patógeno, y el proceso se denomina “priming” y tiene un costo energético mínimo sobre el crecimiento vegetal porque sólo se desencadena la respuesta defensiva en caso de reconocimiento de un posible atacante (Grobkinsky *et al.*, 2012).

Las vías de señalización que controlan estos tipos de resistencia y las respuestas de defensa asociadas a ellas, han sido caracterizadas en el modelo de *Arabidopsis thaliana* (Van der Ent *et al.*, 2008; Vitalini, 2012). En general, los patógenos biotrófos parecen ser más sensibles a las respuestas reguladas por el AS (SAR), relacionadas con la muerte celular programada, mientras que en los patógenos necrótrofos, y los insectos, suelen ser sensibles a las respuestas dependientes de las hormonas ácido jasmónico y etileno (Glazebrook, 2005; Thomma *et al.*, 2001; Ton y Mauch-Mani, 2004).

La cascada de señalización de determinadas fitohormonas, cobran un papel esencial en la modulación del sistema de defensa de la planta, traduciendo estos primeros eventos de señalización en la activación de la respuesta de defensa más apropiada. Entre los grupos de fitohormonas conocidos, el ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) se reconocen como las principales hormonas de defensa de las plantas, de importancia fundamental para la señalización en las respuestas a estreses bióticos. El AS es una fitohormona que regula principalmente la ruta de señalización durante la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos biotrófos, principal regulador de la muerte programada. Es un compuesto fenólico sintetizado en el lugar de la infección tras el ataque del patógeno mediante dos rutas enzimáticas distintas, por un lado, la asociada a la fenilalanina amonio liasa (PAL) y por otro lado la ruta asociada al isocorismato sintasa (ICS/SID2) y frecuentemente, se activa de manera sistémica, en las partes distales de la planta. El AJ y sus derivados, conocidos como jasmonatos, son componentes lipídicos sintetizados a través de la ruta de biosíntesis de oxilipinas y a diferencia del AS, suelen ser efectivos para la defensa de la planta frente a necrófitos e insectos (Attaran *et al.*, 2009; Cavallo y Raggi 2002; Cheong y Choi, 2003; Devoto y Turner *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 2009; Katsir *et al.*, 2008; Mauch-Mani y Métraux, 1998; Métraux *et al.*, 2002; Nahar *et al.*, 2011; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Siddiqui *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2003; Thaler *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2002; Vijayan *et al.*, 1998). Las hormonas ET, ABA, auxinas, ácido giberélico (GA), citocininas (CK), brasinosteroides (BR) y péptidos están también implicadas en las vías de señalización, aunque su rol en la biodefensa está menos dilucidado (Bari *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010; Nuñez-Pastrana *et al.*, 2011).

Además, se han identificado productos que generan moléculas señal disparadoras de respuestas de defensa, denominados **elicitores**, como: **peróxido de hidrógeno** (Kauss y Jeblick, 1996; Lopez-Delgado *et al.*, 1998), **AS** (McDowell y Dangl, 2000; Pieterse y Van Loon, 1999; Schmelz *et al.*, 2003), **AJ** (Conconi *et al.*, 1996), **etileno** (ET) (Lorenzo *et al.*, 2003; McDowell y Dangl, 2000; Thomma *et al.*, 2001), **tiamina** (Salgado-Siclán, 2012), **riboflavina** (Liu *et al.*, 2010), **BABA** (Ton y match-mani *et al.* 2004) y **moléculas del patógeno invasor** (Punja, 2001). Incluso, puede ser inducida por elicitores exógenos como la luz ultravioleta (Potrebko *et al.*, 2009; Zhang y Bjorn, 2009).

La **respuesta de hipersensibilidad HR**, es un mecanismo de defensa activo que implica el reconocimiento del agresor, y la expresión de respuestas de estrés oxidativo que conducen a la muerte celular localizada rápida de las células y/o tejidos ubicados alrededor del patógeno, asociada con la restricción del crecimiento del mismo (Albuquerque *et al.*, 2010; Bellow, 2012; Godoy Labanca, 2002; Hammerschmidt, 2003; Martins dos Santos Soares *et al.*, 2004; Ordeñana *et al.*, 2002; Perrone *et al.*, 2003; Stuver y Custers, 2001). Existe evidencia de que la muerte sobreviene por dos procesos, el primero involucra el propio metabolismo de la planta por el cual se activan caminos biosintéticos, asociados a sistemas antioxidantes redox y producción de especies reactivas

de oxígeno (compuestos o radicales libres que resultan tóxicos para ambos, patógeno y célula vegetal) (Renard-Merlier *et al.*, 2007). El otro mecanismo, es una respuesta apopléctica genéticamente programada frente al reconocimiento del patógeno que priva a los patógenos de alimentación y los confina al sitio de infección (De Gara *et al.*, 2003; Govrin y Levine, 2000). Esta resistencia ha sido estudiada en muchos y diversos modelos vegetales como trigo (Renard-Merlier *et al.*, 2007), tabaco (Dorey *et al.*, 1997; Greenberg, 1997), maíz, tomate y *Arabidopsis thaliana* (Sanzón y Zavaleta, 2011), etc.

Dentro de las respuestas secundarias, las **proteínas PR** (pathogenicity related) poseen una actividad microbiana que se manifiesta notablemente por la degradación de la pared celular del hongo y las mismas, se caracterizan por su solubilidad, menor estabilidad en medio ácido y su resistencia a la proteólisis. Estas propiedades le permiten mantener condiciones desfavorables para la colonización de un patógeno (Lambert, 2011). Entre ellas, las más estudiadas son las enzimas hidrolíticas quitinasas y glucanasas (Bargabus *et al.*, 2002; Faize *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003; Little y Magill 2003; Lorito *et al.*, 1993). También, se ha comprobado la capacidad antifúngica *in vitro* de proteínas de bajo peso molecular, como la osmotin y thaumatina (Liu *et al.*, 1995); péptidos antimicrobiales como las defensinas y tioninas, cuya expresión es regulada por AJ y ET (Broekaert *et al.*, 1995; Do *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 2000; Veronese *et al.*, 2003); proteínas inactivadoras ribosomales (RIP) y productos que destruyen o neutralizan los productos fúngicos como poligalacturonasa, ácido oxálico y lipasas (Blée, 2002; Orozco de Amezcuita *et al.*, 1997; Punja, 2001; Wegener, 2002). Por otro lado, existen mecanismos que implican modificaciones de morfología y estructura celular ligadas a la acumulación de ciertos compuestos. La pared celular está reforzada por la oxidación de constituyentes insolubles por efecto de peroxidases, proteínas ricas en prolina, glicinas e hidroxiprolinas (Bellow, 2012).

Otras respuestas secundarias corresponden a las **fitoalexinas**, que son aquellos compuestos, de bajo peso molecular, con actividad antimicrobiana, que pueden ser inducidos “*de novo*”, después de la exposición a un estrés. Estos compuestos forman parte de las barreras de las plantas, se presentan confinados en los tejidos y son liberados durante la infección. La inducción de fitoalexinas frente a una infección microbiana es reconocida como un importante mecanismo de defensa de las plantas y uno de los más investigados. Su producción requiere un gasto de energía por parte de la planta y no son esenciales para los procesos metabólicos básicos. Existen numerosos estudios en gimnospermas, así como en numerosas monocotiledóneas y dicotiledóneas, que comprueban la existencia de metabolitos secundarios con un rol defensivo (Abú-Nada *et al.*, 2007; Abraham *et al.*, 1999; Ahuja *et al.*, 2012; Boue *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2003; Gou *et al.*, 2011; Hrazdina *et al.*, 1997; Ignat *et al.*, 2011; Kovakou *et al.*, 2006; Lozovaya *et al.*, 2004; Lygin *et al.*, 2010; Mahatma *et al.* 2009; Mc Nally *et al.*, 2003; Mazid *et al.*, 2011; Mert-Türk *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2003; Salles *et al.*, 2002).

El azufre elemental es la única fitoalexina inorgánica detectada y su producción en respuesta a hongos no ocurre en todas las plantas. Se ha encontrado en cacao, tomate, algodón, tabaco y haba (Williams y Cooper, 2003). En función de su origen, pueden considerarse tres tipos de fitoalexinas: terpenoides (isoprenoides) derivados del isopentenildifosfato (Augustin *et al.*, 2011; De Alwis *et al.*, 2009; Escorriaza, 2012; Hill y Parker, 2000; Nagegowda *et al.*, 2008; Tholl *et al.*, 2006), alcaloides derivados de aminoácidos, como los alcaloides de pirrolizidina (PAs) (Hartmann y Orber, 2000; Joosten y Van Veen, 2011) y compuestos fenólicos derivados de la fenilalanina y la ruta de condensación acetato-malonato (Bellow, 2012, Danielsson *et al.*, 2011; Dixon, 2001; Mazid *et al.* 2011).

Dentro de los compuestos fenólicos, los denominados flavonoides constituyen una familia de moléculas aromáticas cuyo rol como pigmentos rojos, azules y violetas en las plantas es bien conocido; participan en procesos de señalización entre plantas, en la fertilidad de yemas de algunas especies, en procesos de defensa frente a microorganismos y en la protección frente a los rayos ultravioletas. Este conjunto incluye siete subgrupos de compuestos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanodiolos, antocianinas, taninos condensados (proantocianidinas) y las denominadas auronas, encontrados en la mayoría de las plantas superiores (Winkel-Shirley, 2001). Por otro lado, se encuentran los estilbenos, estrechamente relacionados a los flavonoides, de gran interés para la salud humana (Medina-Bolivar *et al.*, 2007; Winkel-Shirley, 2001). Su biosíntesis ha sido estudiada extensamente en legumbres por Laplaze *et al.* (1999) y McNally *et al.* (2003). Son considerados de gran importancia en los procesos de resistencia de la madera a la pudrición ya que poseen capacidad fungistática o fungitóxica frente a hongos de *Polyporaceae*, *Thelephoraceae* y *Agaricaceae* (Barry *et al.* (2001); Hart y Shrimpton, 1979). Además, existen numerosos estudios que describen la activación transcripcional de genes de defensa que originan producción de compuestos fenólicos en distintas especies vegetales (Bishop, 2002; Debona *et al.*, 2012; Die *et al.*, 2009; Dodds and Schwechheimer, 2002; Fluhr, 2001; Gaige *et al.*, 2010; García-Pineda *et al.*, 2004; Gutha *et al.* 2010; Hammerschmidt, 2003; Little and Magill, 2003; Moreno *et al.*, 2009; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001; Ponciano *et al.*, 2003; Ryan, 2000; Soria-Guerra *et al.*, 2010; Stahl y Bishop, 2000; Stuiver y Custers, 2001; Tischner *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2001).

1.6. Mecanismos de defensa en *Vitis vinífera*.

Entre los mecanismos de **defensa pasiva**, en vid, se señala la formación de aglomerados densos de calosa (polímetros de unidades de glucosa unidas por puentes β -1,3); o polisacáridos como celulosa, pectinas y lignina; extensinas (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina constituyentes de la pared pecto-celulósica), sílice y compuestos fenólicos polimerizados, entre la pared celular y la membrana plasmática a nivel del sitio de penetración de patógeno (Boubakri *et al.*, 2012;

Lambert, 2011; Repka *et al.*, 2004. En algunas vitáceas como *V. labrusca*, se observan en las hojas, pelos que impiden la adhesión y germinación de esporas. Por otro lado, la cutícula hidrófoba, compuesta de ceras y cutina (poliéster de ácidos grasos) constituye una barrera física que obstruye el agua que necesita el microorganismo para desarrollarse.

En referencia a **mecanismos de defensa activos** estudiados en vid, se incluyen la producción de **peróxido de hidrógeno** (H₂O₂) y **especies reactivas de oxígeno (ROS)** que producen daños oxidativos ligados a diferentes enzimas y metabolitos secundarios, así como a la expresión de genes asociados, que limitan el desarrollo del patógeno (Adrian *et al.*, 2012; Berli *et al.*, 2011; Dani *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Majer *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2009; Pontin *et al.*, 2010; Selma *et al.*, 2008; Verhagen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2002). También se ha comprobado en vid la **producción de HR** que resulta en la muerte de células y producción de fitoalexinas frente a *P. viticola* (Boubakri *et al.*, 2013; Casagrande *et al.*, 2011; Godart *et al.*, 2009; Lambert, 2011); *Erysiphe necator* (Araya *et al.*, 2005, Ramming *et al.*, 2012) y *B. cinerea* (Deloire *et al.*, 2000; Repka *et al.*, 2006).

Otro mecanismo de defensa activa, que es señalado en vid, consiste en **la acumulación de proteínas PR** como: β -1,3-glucanasas, quitinasas y osmotinas. Estas proteínas poseen acción antifúngica directa debida a la hidrólisis de la quitina estructural de las paredes fúngicas y la producción de fragmentos de β -1,3-glucanos y residuos de N-acétyl-glucosamina, y actúan como elicitores microbianos que refuerzan la señalización de respuestas de defensa en vid (Belhadj *et al.*, 2006; Deloire *et al.*, 2000; Derckel *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 1999; Kraeva *et al.*, 1998; Lambert 2011; Milli *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2003; Nookaraju *et al.*, 2012; Polesani *et al.*, 2010; Perazolli *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2009). Asimismo, se evaluó la producción de quitinasas y β -1,3-glucanasas, por aplicación de elicitores AJ (Repka *et al.*, 2004), Etefón (Belhadj *et al.*, 2008), luz UV (Bonomelli *et al.*, 2004) y AS (Derckel *et al.*, 1996). Recientemente, se han identificado en vid, otras proteínas conocidas como “Lipid Transfer Proteins”, que interfieren en la transferencia de lípidos en las membranas celulares fúngicas (Lambert, 2011). Entre ellas, las defensinas, proteínas ricas en cisteína, se detectaron con actividad antimicrobiana frente a *P. viticola* y *B. cinerea* (Giacomelli *et al.*, 2012; Polesani *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

En vid, se conoce que la **SAR** no sólo concierne a las células del sitio de penetración del patógeno, sino que se expresan también en otras partes sanas. Depende, además, de una fuerte acumulación de AS, refuerzo de paredes, síntesis de fitoalexinas y proteínas PR (Busam *et al.*, 1997; Maldonado *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2007). Las rizobacterias no patógenas como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* aisladas de vides, inducen ISR frente hongos, bacterias y virus (Compant *et al.*, 2013). El AJ y el ET regulan este tipo de resistencia en vid (Pieterse y Van Loon, 1999). Existen trabajos que ratifican su acción como estimuladores de defensa con resultados

promisorios (Barka *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2013; Conrath *et al.*, 2002; Eftekhari *et al.*, 2010; García-Garrido y Ocampo, 2002).

Una de las respuestas de defensa secundarias más estudiadas, es la acumulación de **fitoalexinas**. Se comprobó la producción de compuestos fenólicos (isoflavonoides, estilbenos, fenantrenos, benzofuranos) (Chong *et al.*, 2009; Repka *et al.*, 2004;), terpenos (Bohlman *et al.*, 1998; Escoriza, 2012; Gil *et al.*, 2012; Hampel *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2010), enzimas hidrolíticas, ácidos grasos poliácetilénicos, productos de oxidación de los ácidos grasos y compuestos nitrogenados. Numerosos estudios demuestran que las fitoalexinas fenólicas están implicadas en la resistencia de *Vitis* spp. a *Botrytis cinerea* (Baarlen *et al.*, 2007; Bessis *et al.*, 2002; Borie *et al.*, 2004; Commun *et al.*, 2003; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001; Jeandet *et al.*, 2000; Jean-Denis *et al.*, 2006; Langcake *et al.*, 1981; Mohamed *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2010; 2011), a Peronospora (Boubakri *et al.* 2012; Gindro *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2011; Malacarne *et al.*, 2011), a hongos de madera (Bruno y Sparapano, 2007a; Lima *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011) y a Oidio (Schnee *et al.*, 2008; Shiraishi *et al.*, 2010).

Actualmente, con el advenimiento de nuevas técnicas moleculares, ha sido posible profundizar los estudios de **activación transcripcional de genes de defensa**, relacionados con el refuerzo de paredes celulares, producción de fitoalexinas y síntesis de proteínas con actividad hidrolíticas inhibitoras de *B. cinerea* (Caillot *et al.*, 2012; Figuereido *et al.*, 2008); *P. viticola* (Dai *et al.*, 2012; Legay *et al.*, 2011; Polesani *et al.*, 2008); *Xyllela fastidiosa* (Shi *et al.*, 2013); la enfermedad Bois Noir producida por un fitoplasma (Albertazzi *et al.*, 2009); filoxera (Dietrich *et al.*, 2010) y *Erysiphe necator* (Fekete *et al.*, 2009, Wakefield *et al.*, 2011).

A nivel mundial, prospera la aplicación de **elicitors** sobre el follaje del viñedo, los cuales, incrementan la tolerancia de las plantas frente a distintos organismos (Romanazi *et al.*, 2013). Se han estudiado un amplio rango de factores bióticos o abióticos, que pueden elicitar los mecanismos de defensa de la vid frente a *P. viticola* y *B. cinerea* dentro de los cuales se incluyen: **β -glucanos** llamados laminarinas (polimeros de glucosa unidas por puentes β), liberados por la degradación de la celulosa vegetal por acción de celulasas microbianas o inversamente, por o por la degradación de la pared fúngica debido a β -glucanasas vegetales (Aziz *et al.*, 2004; Trouvelot *et al.*, 2008); **ergosterol**, componente de la membrana de células fúngicas (Laquitaine *et al.*, 2006); **quitosano**, formado por oligómeros de quitina desacetilada (Barka *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007; Trotel-Aziz *et al.*, 2006); **benzo(1,2,3)tiadiazol-7-carbotioato de S-metilo (BTH)**, análogo del AS (Harm *et al.*, 2011; Iriti *et al.*, 2004; Perazzolli *et al.*, 2008); **etefón**, precursor del etileno (Belhadj *et al.*, 2008); **JA** y **MeJa** (Belhadj *et al.* 2006; Donnez *et al.*, 2011; Larronde *et al.*, 2003; Repka *et al.* 2004); **ácido β -aminobutirico (BABA)** (Fischer *et al.*, 2009; Hamiduzzaman *et al.*, 2005; Harm *et al.*, 2011; Khiook *et al.*, 2013; Slaughter *et al.*, 2008; Steimetz *et al.*, 2012; Tassoni *et al.*, 2012); **AS** (Nikfardjam *et al.*, 1999); **salicilato de sodio (NaSA)** y **ácido isonicotínico (INA)** (Zhang *et*

al., 2001); **diaminobenzidina (DAB)** (Trouvelot *et al.*, 2008), **bestatina** (Repka, 2002), **tunicamicina** (Repka *et al.*, 2006; Repka y Fischerová, 2001), **sulfato de cobre** (Aziz *et al.*, 2006), **Cl₃Al** (Adrian *et al.*, 1996; Borie *et al.*, 2004; Jeandet *et al.*, 2000), **indanoylisoleucina (In-Ile)**, **N-linolenoyl-l-glutamina (Lin-Gln)** (Cai *et al.*, 2012), **antraquinonas**, **ácido 8-β-aminobutírico** y **fosetil-Al** (Schnee, 2013). Además, se ha reportado que determinados niveles de radiación de luz ultravioleta inducen la expresión de varios genes usualmente involucrados en respuestas de defensa en vid.

En particular, cuando la vid se encuentra frente hongos de madera, responde con la deposición de suberina y modificaciones anatómicas de xilema y floema para restringir los agentes patógenos dentro de los vasos conductores, e impedir la circulación sistémica de las toxinas que éstos producen. Se sabe que esta oclusión está controlada por la vía de señalización del ET (Pouzolet, 2012; Sun *et al.*, 2007, 2011; Troccoli *et al.*, 2001). Asimismo, se ha comprobado la transcripción de genes de defensa que codifican para proteínas PR que se acumulan en hojas afectadas con enfermedades de madera de la vid (Camps *et al.*, 2010; Letousey *et al.*, 2010; Rotter *et al.*, 2009; Valtaud *et al.*, 2009). También, se ha demostrado que los compuestos fenólicos se acumulan en los vasos xilemáticos y células adyacentes a aquéllas infectadas, produciendo la obstrucción de los vasos (Del Río *et al.*, 2004; Troccoli *et al.* 2001).

1.7. Justificación del trabajo. Hipótesis y objetivos de la investigación

A nivel internacional, existen métodos de control eficaz de las enfermedades Oidio, Peronospora y Podredumbres de la vid. Por el contrario, las enfermedades de la madera de la vid, no poseen método efectivo de control. El control de estas enfermedades es difícil debido a la diversidad de especies en juego, la aparición de síntomas externos azarosa y después de un período de incubación largo (7 años o más) y en consecuencia, por la falta de fungicidas homologados.

En Argentina, durante mucho tiempo, la falta de conocimientos etiológicos, epidemiológicos y de medidas de control curativas, contribuyeron a la creciente incidencia y severidad de la Hoja de malvón y el decaimiento de vides jóvenes, dañando el patrimonio vitícola, base de la economía regional de Cuyo. Asimismo, la insuficiente legislación que regula la sanidad de las plantas provenientes de vivero, sumada a la carencia en las metodologías rápidas de detección molecular, han provocado una disminución de calidad sanitaria de viñedos jóvenes.

Por lo expuesto, existe una creciente tendencia mundial a investigar este tipo de enfermedades, evaluándose prácticas culturales preventivas, la eficacia de distintas moléculas químicas, orgánicas y antagonistas biológicos.

En los últimos años, se han planteado estrategias para reducir la enfermedad, aumentando la resistencia natural de la planta a través del enriquecimiento de la concentración endógena de sus

propios metabolitos antifúngicos. Se ha priorizado la identificación de los mecanismos responsables de producir la respuesta como así también, la búsqueda de moléculas capaces de estimular esas reacciones de carácter antifúngico a fin de explorar la eficacia de la aplicación exógena de fitoalexinas en los viñedos para aumentar la tolerancia a enfermedades.

En relación a la protección medioambiental, es indiscutible que optimizar la resistencia vegetal, mediante la propia generación endógena de productos antimicrobianos, es la mejor estrategia para la disminución del uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos en la producción agrícola, con la consiguiente disminución de su impacto ambiental. Por último, es importante destacar el importante efecto sobre el consumo de uva y de vinos, de la obtención de productos naturalmente enriquecidos en trans-resveratrol, la fitoalexina más importante estudiada en vid y cuyos efectos benéficos sobre la salud humana han sido comprobados.

El presente trabajo de investigación contribuye al conocimiento etiológico de especies de *Botryosphaeriaceae*, familia de uno de los hongos que provocan hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes, lo que se considera esencial para desarrollar métodos de control racionales que permitan prevenir y manejar estas enfermedades. Se busca asimismo, el reconocimiento de variedades tolerantes, contribuir a la determinación del rol de los compuestos fenólicos en la defensa de la vid y los mecanismos por los cuales expresan esa tolerancia, lo que constituye una alternativa potencial de control y podría incorporarse a programas de certificación sanitaria.

En respuesta a las necesidades planteadas, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

Capítulo II:

- Hipótesis 1: Especies de *Botryosphaeriaceae* integran una comunidad y están comúnmente diseminadas en los viñedos de las distintas regiones agroclimáticas argentinas donde se realiza el cultivo de la vid, causando decaimiento y muerte de plantas.
- Hipótesis 2: El empleo de caracteres morfológicos y culturales permiten una caracterización útil aunque limitada, de las especies fúngicas de la familia *Botryosphaeriaceae* de Argentina.
- Hipótesis 3: La utilización de las técnicas moleculares permite el desarrollo de métodos selectivos de detección de patógenos y a través de estudios comparativos entre los datos morfológicos y moleculares, se puede caracterizar e identificar fehacientemente las especies del género fúngico en estudio.

Capítulo III:

- Hipótesis 1: Es posible establecer plantas en condiciones *in vitro* y luego condiciones de invernáculo, a partir de estacas de vid de *Vitis Vinifera* L. cvs Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*).

- Hipótesis 2: La vid está expuesta a enfermedades originadas por hongos de madera y posee un sistema de defensa por el cual puede detectar y responder a la presencia de los patógenos asociados.
- Hipótesis 3: En vid, el ataque de especies de *Botryosphaeriaceae* promueve la síntesis de fitoalexinas de naturaleza estilbénica: resveratrol y derivados. Por lo que es posible establecer una escala de tolerancia de las distintas variedades de vid, al hongo *L. theobromae*, en función de sus respuestas de defensa y producción de resveratrol.
- Hipótesis 4: En vid mantenida en condiciones *in vitro*, *L. theobromae* promueve la producción diferencial de resveratrol en el tiempo, en una variedad tolerante respecto a una susceptible.

Asimismo, se plantean entonces los objetivos para cada hipótesis planteada:

Capítulo II:

- Objetivo 1: Aislar y purificar aislamientos de *Botryosphaeriaceae* procedentes de vides con síntomas de enfermedades fúngicas de madera de distintas zonas vitícolas argentinas.
- Objetivo 2: Caracterizar una colección de aislamientos argentinos de *Botryosphaeriaceae*, provenientes de distintas zonas vitícolas argentinas a través de métodos morfológicos clásicos.
- Objetivo 3: Optimizar técnicas de extracción, amplificación, purificación y secuenciación de DNA de *Botryosphaeriaceae*, que permitan la detección rápida y rutinaria de especies de dicho género y asimismo, analizar en conjunto variables morfológicas y moleculares determinando la diversidad de especies presentes en nuestras zonas vitícolas.

Capítulo III:

- Objetivo 1: Optimizar los protocolos de obtención de vides en condiciones *in vitro* y de invernáculo, a partir de plantas de *Vitis Vinifera* L. cvs Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*).
- Objetivo 2: Identificar y evaluar respuestas de defensa de *Vitis* spp. frente a la inoculación con *Lasiodiplodia theobromae*, empleando parámetros de crecimiento *in vitro* y en condiciones de invernáculo.
- Objetivo 3: Desarrollar un método de extracción e identificación de resveratrol y/o sus derivados en hoja, a partir de plantas en maceta en condiciones de invernáculo, determinar si el ataque del hongo *L. theobromae* promueve su producción y definir una escala de tolerancia para las *Vitis* spp. en función de las respuestas de defensa obtenidas y la producción de resveratrol frente al ataque del patógeno.
- Objetivo 4: Estudiar en el sistema *in vitro*, la producción de resveratrol en una variedad susceptible y en una tolerante, a las 8 h, 24 h y 48 h desde la inoculación con *L. theobromae*.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM KJ; PIERCE ML; ESSENBERG M (1999). The phytoalexins Hesoxyhemigossypol and hemigossypol are elicited by *Xanthomonas* in *Gossypium* cotyledons. *Phytochemistry* 52: 829-836.
- ABREO-GIMÉNEZ E (2011). Comunidad fúngica asociada a las enfermedades del tronco en Uruguay: composición, diagnóstico molecular y patogenicidad. Tesis Doctorado PEDECIBA en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- ABU-NADA Y; KUSHALAPPA AC; MARSHALL WD; AL-MUGHRABI K; MURPHY A (2007). Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology* 118:375–391.
- ADRIAN M; JEANDET P; BESSIS R; JOUBERT JM (1996). Induction of phytoalexin (Resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated aluminum chloride (ALCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1979-1981.
- ADRIAN M; TROUVELOT S; GAMM M; POINSSOT B; HÉLOIR MC; DAIRE X (2012). Activation of grapevine defense mechanisms: theoretical and applied approaches. In Merillon, JM. ; Ramawat, KG. (Eds), Plant defence: Biological Control. *Progress in Biological Control*. Springer, New York pp. 314-331.
- AGRIOS GN (1996). Fitopatología. 3. ed., Editorial Uteha, Limusa, México, pp838.
- AGÜERO CB; RODRÍGUEZ JG; MARTÍNEZ LE; DANGL GS; MEREDITH CP (2007). Identity and parentage of Torrontés cultivars in Argentina. *American Journal of Enology and Viticulture* 54:318-321.
- AHUJA I; KISSEN R; BONES AM (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17 (2): 73-90.
- ALBERTAZZI G; MILC J; CAFFAGNI A; FRANCIA E; RONCAGLIA E; FERRARI F; TAGLIAFICO E; STEFANI E; PECCHIONI N (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to *Bois Noir* phytoplasma infection. *Plant Science* 176: 792-804.
- ALBUQUERQUE EVS; GOMES CARNEIRO RMD; COSTA PM; MENDES GOMES ACM; SANTOS M, PEREIRA AA; NICOLE M, FERNANDEZ D; GROSSIDEAS MF (2010). Resistance to *Meloidogyne incógnita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arábica*. *European Journal of Plant Pathology* 127: 365-373.
- ANDERSON AJ, BLEE KA, YANG KY (2006). Commercialization of Plant Systemic Defense Activation: Theory, Problems and Successes. *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* 386-414.
- ANDOLFI A; CIMMINO A; EVIDENTE A; IANNACCONE M; CAPPARELLI R; MUGNAI L; SURICO G (2009). A new flow cytometry technique to identify *Phaeoconiella chlamydospora* exopolysaccharides and study mechanisms of esca grapevine foliar symptoms. *Plant Disease* 93(7): 680-684.
- ARAYA C; ROSALES IM; PRIETO H; PEÑA-CORTÉS H (2005). Caracterización de la respuesta defensiva en vid (cv. Thompson seedles y Carménère) frente a la infección por el hongo biotrófico *Uncinula necator*. XV CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA, 15-18 de Diciembre de 2005, Facultad de Agronomía - Universidad de Tarapacá.
- ATTARAN E; ZEIER TE; GRIEBLEL T; ZEIER J (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 954-971.
- AUGUSTIN JM; KUZINA V; ANDERSEN SB; BAK S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72: 435-457.

- AZIZ A; HEYRAUD A; LAMBERT B (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218: 767–774.
- AZIZ A; TROTEL-AZIZ P; DHUICO L; JEANDET P; COUDERCHET M; VERNET G (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* 96 (11): 1188-1194.
- BAARLEN PV; LEGENDRE L; KANJAL V (2007). Plant defence compound against *Botrytis infection*. Elad *et al.* (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 143-161. 2007 Springer.
- BARGABUS RL; ZIDACK NK; SHERWOOD JE; JACOBSEN BJ (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 289-298.
- BARI R; JONES JDG (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- BARKA EA; EULLAFFROY P; CLÉMENT C; VERNET G (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reporter* 22: 608-614.
- BARKA EA; NOWAK J; CLÉMENT C (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting *Rhizobacterium*, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11): 7246-7252.
- BARRY KM; PEARCE RB; EVANS SD; HALL LD; MOHAMMED CM (2001). Initial defence responses in sapwood of *Eucalyptus nitens* (Maiden) following wounding and fungal inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 63-72.
- BECERRA V; GONZALEZ M; HERRERA ME; ETCHEBARNE F; MIANO JL (2004). Biología de la cochinilla harinosa de la vid *Planococcus ficus* Signoret (*Hemiptera: pseudococcidae*). XX Congreso Brasileiro de Entomología, Gramados RS, Brasil, 5 al 10 de setiembre de 2004.
- BELHADJ A; SAIGNE C; TELEF N; CLUZET S; BOUSCAUT J; CORIO-COSTET MF; MÉRILLON JM (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24): 9119–9125.
- BELHADJ A; TELEF N; CLUZET S; BOUSCAUT J; CORIO-COSTET MF; MÉRILLON JM (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14): 5781–5787.
- BELLOW S (2012). Etude des composés phenoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou. Tesis Doctorado en Ciencias, Université Paris-Sud – UFR des Sciences, France.
- BERLI FJ; FANZONE M; PICCOLI P; BOTTINI R (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 4874–4883.
- BERGER S; SINHA AK; ROITSCH T (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58 (15): 4019-4026.
- BESSIRE M; CHASSOT C; JACQUAT AC; HUMPHRY M; BOREL S; PETETOT JMC; MÉTRAUX JP; NAWRATH C (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *Embo Journal* 26: 2158-2168.
- BESSIS R; DOUILLET AC; ADRIAN M; JEANETTE P; JOUBERT JM (2002). Stratégies for using natural vine defence mechanisms against parasite fungus in particular *Botrytis cinerea*. *Bulletin de l'O.I.V.* Año 2002: 853-854.
- BISHOP DL (2002). Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 64-71.

- BLANCO LM (2012). Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeacremonium aleophilum* y otros hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León. Tesis doctoral Instituto Tecnológico Agrario, Universidad de León, España.
- BLÉE E (2002). Impact of phyto-oxylinins in plant. *Trends in Plant Science* 7(7): 315-321.
- BOHLMANN JR; MEYER-GAUEN G; CROTEAU R (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4126–4133.
- BORIE B; JEANDET P; PARIZE A; BESSIS R; ADRIAN M (2004). Resveratrol and Stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(1): 60-64.
- BONOMELLI A; MERCIER L; FRANCHEL J; BAILLIEUL F; BENIZRI E; MAURO M-C (2004). Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(1): 51-59.
- BOUBAKRI H; WAHAB MA; CHONG J, BERTSCH C; MLIKI A; SOUSTRE-GACOUGNOLLE I (2012). Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defenses responses, including HR like-cell death. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 120-133.
- BOUBAKRI H; CHONG J; POUTARAUD A; SCHMITT C; BERTSCH C; MLIKI A; MASSON JE; SOUSTRE-GACOUGNOLLE I (2013). Riboflavin (Vitamin B2) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 136:837–855.
- BOUE SM; CLEVELAND TE; CARTER-WIENTJES C; SHIH BY; BHATNAGAR D; MCLACHLAN JM; BUROW ME (2009). Phytoalexin-Enriched Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2614–2622.
- BROEKAERT WF; TERRAS FRG; CAMMUE BPA; OSBORN RW (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* 108: 1353-1358.
- BRUEZ E (2013). Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca. Thèse n° 2027, Doctorat de l'Université Bordeaux.
- BRUNO G; SPARAPANO L (2007a). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II.Characterization of biomolecules in xylem sap andleaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 195–208.
- BRUNO G; SPARAPANO L (2007b). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 182-194.
- BRUNO G; SPARAPANO L (2007c). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 210-229.
- BUSAM C; KASSEMAYER H-H; MATERN U (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology* 115: 1029-1031.
- CAI Z; KNORRA D; SMETANSKA I (2012). Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology* 50: 29–34.
- CAILLOT S; RAT S; TAVERNIER M-L; MICHAUD P; KOVENSKY J; WADOUACHI A; CLÉMENT C; BAILLIEUL F; PETIT E (2012). Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. *Carbohydrate Polymers* 87:1728-1736.

- CAMPS C; KAPPEL C; LECOMTE P; LÉON C; GOMÉS E; COUTOS-THÉVENOT P; DELROT S (2010). A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of experimental botany* 61 (6): 1719.
- CASAGRANDE K; FALGINELLA L; CASTELLARIN SD; TESTOLIN R; DI GASPERO G (2011). Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine Downy mildew. *Planta*, 234 (6): 1097-1109.
- CASASSA F; SARI S; AVAGNINA S; LONGONE V; CÉSARI C; ESCORIAZA G; CATANIA C; GATICA M (2010). Effects of “Hoja de malvón” disease on the composition, sensory properties and preference of Malbec wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of wine Research* 1: 63-73.
- CAVALLO V; RAGGI V (2002). Jasmonic acid accumulation in bean hypersensitively resistant to *Uromyces phaseoli*. *Journal of Plant Pathology* 84 (2): 77-82.
- CÉSARI C; GATICA M (2001). Microflora asociada a la necrosis de madera en vides con hoja de malvón y al decaimiento de plantas jóvenes. The viticultural Industry. Virtual Library II. VIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo, Uruguay.
- CÉSARI C; ESCORIAZA G; GATICA M (2002). Análisis de la Distribución espacial de la enfermedad hoja de malvón en viñedos de Mendoza. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas Universidad Nacional de Río Cuarto: 98. Córdoba, Argentina.
- CÉSARI C (2004). Estudios preliminares sobre el efecto de Metil jasmonato y ácido salicílico en el comportamiento *in vitro* de Cabernet sauvignon en presencia de *Inocutis jamaicensis*. Tesis Magister Scientiae en viticultura y Enología, UNCuyo, Mendoza, Argentina.
- CÉSARI C; PONCE M; ESCORIAZA G; LONGONE V; GATICA M (2006). Effect of Methyl jasmonate and Salicylic acid on *in vitro* plants of Cabernet sauvignon in the presence of *Inocutis jamaicensis*. 5th International Workshop on Grapevine Trunk diseases, California, USA: 85.
- CHEONG J-J; CHOI YD (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in genetics* 19(7):409-413.
- CHONG J; POUTARAUD A; HUGUENEY P (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177: 143-155.
- CHUNG M; PARK MR; CHUN JC; YUN SJ (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science* 164: 103-109.
- COMMUN K; MAURO M-C; CHUPEAU Y; BOULAY M; BURRUS M; JEANDET P (2003). Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 317-323.
- COMPANT S; BRADER G; MUZAMMIL S; SESSITSCH A; LEBRIHI A; MATHIEU F (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl* 58: 435-455.
- CONCONI A; MIQUEL M; BROWSE JA; RYAN CA (1996). Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Plant Physiology* 111: 797-803.
- CONRATH U; PIETERSE C; MAUCH-MANI B (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7: 210-216.
- COUTOS-THÉVENOT P; POINSSOT B; BONOMELLI A; YEAN H; BREDA C; BUFFARD D; ESNAULT R; HAIN R; BOULAY M (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany* 52(358): 901-910.

- DAI R; GE H; HOWARD S; QIU W (2012). Transcriptional expression of stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet sauvignon grapevine plant. *Science* 197: 70-76.
- DANI C; OLIBONI LS; AGOSTINI F; FUNCHAL C; SERAFINI L; HENRIQUES JA; SALVADOR M (2010). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro* 24: 148–153
- DANIELSSON M; LUNDÉN K; ELFSTRAND M; HU J; ZHAO T; ARNERUP J; IHRMARK K; SWEDJEMARK G; BORG-KARLSON A-K; STENLID J (2011). Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to Heterobasidion spp. Infection. *BMC Plant Biology* 11: 154.
- DARRIEUTORT, G; LECOMPTE P (2007). Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 50-57.
- DE ALWIS R; FUJITA K; ASHITANI T; KURODA K (2009). Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. *Plant biotechnology Rep* 3: 57-65.
- DE GARA L; DE PINTO MC; TOMMASI F (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863–870.
- DEBONA D; RODRÍGUES FÂ, RIOS JA; NASCIMENTO KJT (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102: 1121-1129.
- DEL RÍO JA; GOMEZ P; BÁIDEZ A; FUSTER MD; ORTUÑO A; FRIAS V (2004). Phenolic compounds have a role in the defense mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 87-94.
- DELOIRE A; KRAEVA E; ANDARY C (2000). Les defenses naturelles de la vigne. Natural grapevine defenses. *Progrès Agricole et Viticole* 117(11): 254-262.
- DERCKEL J-P; LEGENDRE L; AUDRAN J-C; HAYE B; LAMBERT B (1996). Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119: 31-37.
- DERCKEL J-P; BAILLICUL F; MANTEAU S; AUDRAN J-C; HAYE B; LAMBERT B; LEGENDRE L (1999). Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89(3): 197-203.
- DEVOTO A; TURNER JG (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* 92: 329-337.
- DI MARCO S, MAZULLO A, CALZARANO F, CESARI A (2000). The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 237-240.
- DIE JV; GONZÁLEZ VEDEJO CI; DITA MÁ; NADAL S; ROMÁN B (2009). Gene expresión análisis of molecular mechanisms of defence induced in *Medicago truncatula* parasitized by *Orobanche crenata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 635-641.
- DIETRICH A; WOLF T; EIMERT K; SCHRODER B (2010). Activation of gene expression during hypersensitive response (HR) induced by auxin in the grapevine rootstock cultivar ‘Borner’. *Vitis* 49 (1): 15-21.
- DIXON RA (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- DO HM; LEE SC; JUNG HW; SOHN KH; HWANG BK (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science* 166: 1297–1305.
- DODDS PN; SCHWECHHEINER C (2002). A breakdown in defense signaling. *The Plant Cell Supplement* S5-S8.

- DONNEZ D; KIMB K-H; ANTOINE S; CONREUXC A; DE LUCA V; JEANDET P; CLEMENT C; COUROTA E (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry* 46: 1056-1062.
- DOREY S; BAILLIEUL F; PIERREL MA; SAINDRENAN P; FRITIG B; KAUFFMANN S (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. St Paul: APS Press, 10: 646 – 655.
- DUBOS B (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. Editions Féret. Bordeaux, France. 176p.
- DULA T; KAPPES EM; HORVATH A; RABAI A (2007). Preliminary trials on treatment of esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 91-95.
- DUPONT JS; MAGNIN S; CESARI C; GATICA M (2002). ITS and B tubulin markers to delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *P. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research* 106(10): 1143-1150.
- DURAN M; AGÜERO C; MARTÍNEZ L (2011). Assessing the identity of the variety “Pedro Gimenez grown in Argentina through the use of microsatellite markers. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 43:2 192.
- DURRANT WE; DONG X (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- EFTEKHARI M; ALIZADEH M; MASHAYEKHI K; ASGHARI H; KAMKAR B (2010). Integration of arbuscular mycorrhizal fungi to grape vine (*Vitis vinifera* L.) in nursery stage. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology* 1 (2): 102-111.
- ESCORIAZA G; CÉSARI C; CÉSARI M, GATICA M (2005). Growth control of *Inocutis jamaicensis* by antagonistic fungi *in vitro*. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Stellenbosch, South Africa: 90.
- ESCORIAZA G; LONGONE V; CÉSARI C; GATICA M (2008). Control a campo de hongos de madera de la vid. I Congreso Argentino de Fitopatología. Córdoba, Argentina: 247.
- ESCORIAZA G; D’INNOCENZO S; CÉSARI C; LONGONE V (2011). Relevamiento, detección y caracterización de bacterias fitopatógenas asociadas al síndrome de agalla y descortezado del tronco de la vid. SAVE 2011. 1° Simposio Argentino de viticultura y Enología, Mendoza, Argentina.
- ESCORIAZA MG (2012). Estudio de los mecanismos de defensa de la vid frente al ataque de *Phaeoacremonium parasiticum*, hongo asociado a las enfermedades de madera de la vid (*Vitis vinifera* L.). TESIS doctorado Programa de Posgrado en Biología, PROBIOL, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- FAIZE M; MALNOY M; DUPUIS F; CHEVALIER M; PARISI L; CHEVREAU E (2003). Chitinases of *Trichoderma atroviridae* induced scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology* 93 (12): 1496-1504.
- FANZONE ML. (2012). Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. Tesis doctoral Universitat Rovira I Virgili, Barcelona, España. URL: <http://hdl.handle.net/10803/81715>.
- FELICIANO A; GUBLER WD (2001). Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S387-S393.
- FEKETE C; FUNG RWM; SZABÓ Z; QIU W; CHANG L; SCHACHTMAN DP; KOVÁCS LG (2009). Up-regulated transcripts in a compatible powdery mildew-grapevine interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 732-738.

- FERNÁNDEZ PORTELA J (2013). La evolución reciente del sector vitivinícola internacional. GeoGraphos. Grupo Interdisciplinario de Estudios Críticos y de América Latina (GIECRYAL) de la Universidad de Alicante, 4 (39): 171-192.
- FERREIRA J; MATTHEE F; THOMAS A (1999). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81(3): 283-287.
- FIGUEREIDO A; FORTES AM; FERREIRA S; SEBASTIANA M; CHOI YH; SOUSSA L; ACIOLI-SANTOS B; PESSOA F; VERPOORTE R; PAIS MS (2008). Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3371-3381.
- FISCHER MJC; FARINE S; CHONG J; GUERLAIN P; BERTSCH C (2009). The direct toxicity of BABA against grapevine ecosystem organisms. *Crop Protection* 28(8); 710-712.
- FLUHR R (2001). Sentinels of Disease. Plant Resistance Genes. *Plant Physiology* 127: 1367-1374.
- GAIGE AR; AYELLA A; SHUAI B (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 412-418.
- GARCÍA-GARRIDO JM; OCAMPO JA (2002). Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53: 1377-1386.
- GARCÍA-JIMÉNEZ J (2007). Maladies fongiques du bois. En "Groupe de travail de la vigne: Les parasites de la vigne. Strategies de protection raisonnée": 232-241. Editions La Vine-Dunod. París (Francia).
- GARCÍA-JIMÉNEZ J (2010). Problemática del manejo de algunas enfermedades fúngicas de reciente aparición. *Phytoma España* 222: 82-84.
- GARCÍA-PINEDA E; CASTRO-MERCADO AE; LOZOYA-GLORIA E (2004). Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Science* 166: 237-243.
- GATICA M; FASCIOLO G; ORIOLANI E; HERRERA C (1997a). Incidencia y severidad de la hoja de malvón de la vid en Mendoza. XXII Congreso Mundial de la vid y del Vino. Buenos Aires, Argentina, 1-3 de diciembre de 1997, Volumen 1.
- GATICA M; RAJCHENBERG M; ORIOLANI E (1997b). Hongos asociados a la hoja de malvón de la vid en Mendoza. Res. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Montevideo, Uruguay, 12-17 de Octubre de 1997: 281.
- GATICA M; BRAVÍN L; ORIOLANI E (1999). Incidencia económica de la hoja de malvón de la vid. VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. La Vitivinicultura del Hemisferio Sur, Mendoza, Argentina, 28 de noviembre-3 de diciembre: 213-218.
- GATICA M; DUBOS B; LARIGNON P (2000a). The "hoja de malvón" grape disease in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 41-45.
- GATICA M; CESARI C; PICCOLO R (2000b). Distribución espacial e incidencia de la enfermedad "hoja de malvón" en viñedos de Mendoza, Argentina. *Horticultura Argentina* 19:46.
- GATICA M; CÉSARI C; MAGNIN S; DUPONT J (2001). *Phaeoacremonium* species isolated from plants with "hoja de malvón" and young vines decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 317-334.
- GATICA M; CÉSARI C; ESCORIAZA G (2004). *Phellinus* species inducing hoja de malvón symptoms on leaves and wood decay in mature field-grown grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 59-65.
- GATICA M; LONGONE V; CÉSARI C; ESCORIAZA G; ARANA A; PRATES J; BUSTOS J; SOSA S; GALLINA M; GASPARINI ML; VILLAR E (2007). Incidencia de la hoja de malvón de la vid en diferentes regiones vitícolas argentinas. XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Mendoza, Argentina.

- GIACOMELLI L; NANNI V; LENZI L; ZHUANG J; DALLA SERRA M; BANFIELD MJ; TOWN CD; SILVERSTEIN KAT; BARALDI E; MOSER C (2012). Identification and characterization of the Defensin-Like Gene family of grapevine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(8): 1118–1131.
- GIL M; PONTIN M; BERLI F; BOTTINI R; PICCOLI P (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry* 77:89–98.
- GINDRO K; ALONSO-VILLAVERDE V; VOINESCO F; SPRING J-L; VIRET O; DUBUIS P-H (2012). Susceptibility to downy mildew in grape clusters: New microscopical and biochemical insights. *Plant Physiology and biochemistry* 52: 140-145.
- GLAZEBROOK J (2005). Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.
- GODART S; SLACANIN I; VIRET O; GINDRO K (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 827-837.
- GODOY LABANCA ER (2002). Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: actividade como inductores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolias em soja (*Glycine max*). Disertación presentada a la Escuela Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidad de Sao Paulo. Piracicaba, Estado de Sao Paulo, Brasil.
- GONCALVES MI; BAVARESCO L; CIVARDI S; FERRARI F (2011). Interactions between *Plasmopara viticola* infection and stilbene synthesis in leaves and berries of ten ‘Cabernet Sauvignon’ clones. *Vitis* 50 (3): 119-122.
- GONZÁLEZ M (2010). *Lobesia Botrana*: polilla de la uva. *Enología* 2: 1-5.
- GOU J-Y; FELIPPES FF; LIU C-J; WEIGEL D; WANG J-W (2011). Negative Regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-Targeted SPL transcription factor. *Plant Cell*, doi 10.1105/tpc.111.084525.
- GOULD N; REGLINSKI T; NORTHCOTT GL; SPIERS M; TAYLOR JT (2009). Physiological and biochemical responses in *Pinus radiata* seedlings associated. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74:121-128.
- GOVRIN EM; LEVINE A (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10(13): 751-757.
- GRAHAM MY; WEIDNER J; WHEELER K; PELOW MJ; GRAHAM TL (2003). Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63:141–149.
- GRAMAJE D; ARMENGOL J (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95 (9): 1040-1055.
- GREENBERG JT (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.
- GROBKINSKY DK; VAN DER GRAAFF E; ROITSCH T (2012). Phytoalexin transgenics in crop protection—Fairy tale with a happy end?. *Plant Science* 19: 54–70.
- GUBLER W; ROLSHAUSEN PE; TROUILLAS FP; URBEZ JR; VOEGEL T ; LEAVITT GM ; WEBER EA (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery & Vineyard* (January/February): 6-26. <http://www.practicalwinery.com/janfeb05/janfeb05p6.htm>.
- GUTHA LR; CASASSA LF; HARBERTSON JF; NAIDU RA (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology* 10: 187.

- HALLEN F; FOURIE PH; LOMBARD PJ (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31(2): 125-132.
- HAMIDUZZAMAN MM; JAKAB G; BARNAVON L; NEUHAUS JM; MAUCH-MANI JM (2005). Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (8): 819–829.
- HAMMERSCHMIDT R; KAGAN IA (2001). Phytoalexins into the 21st century. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 59–61
- HAMMERSCHMIDT R (2003). Dealing with infection: the plant responds in multiple ways. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 191-192.
- HAMPEL D; MOSANDL A; WUST M (2005). Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2652–2657.
- HARM A; KASSEMAYER H-H; SEIBICKE T; REGNER F (2011). Evaluation of chemical and natural resistance inducers against Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 62:2.
- HART JH; SHRIMPTON DM (1979). Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology* 69(10): 1138-1143.
- HARTMANN T; OBER D (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: Leeper FJ, Vederas JC (Eds) *Topics in current chemistry*, Springer, Berlin, 209: 207.
- HAYES MA; FEECHAN A; DRY IB (2010). Involvement of Abscisic Acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*, 153:211–221.
- HIDALGO L (2002). *Tratado de Viticultura General* (3ª edición). Editorial Mundi-Prensa S.A., Madrid, España.
- HILL RA; PARKER MC (2000). Hot off the press. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 3-5.
- HRAZDINA G; BOREJSZA-WYSOCKI W; LESTER C (1997). Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87(3): 868-876.
- IGNAT J; VOLF I; POPA VI (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126 (4): 1821-1835.
- IRITI, M.; ROSSONI, M.; BORGIO, M.; FAORO, F. (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(14): 4406–4413.
- JACOBS A; DRY A; ROBINSON S (1999). Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48(3): 325–336.
- JEANDET P; WESTON LA; HARMON R; ADRIAN M; BREUIL AC; SBAGUI M; DEBORD S (2000). Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: application to the control of grey mould in the vineyard. *ISHS, Acta Horticulturae* 528: 591-596.
- JEAN-DENIS JB; PEZET R; TABACCHI R (2006). Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1112:263–268.
- JOHN S; WICKS TJ; HUNT JS; SCOTT ES (2008). Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14(1): 18-24.

- JOOSTEN L; VANN VEEN JA (2011). Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. *Phytochemistry Review* 10:127–136.
- KACHROO A; ROBIN GP (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 527-533.
- KATSIR L; CHUNG HS; KOO AJK; HOWE GA (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* 11:428–435.
- KAUSS H; JEBLICK W (1996). Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. *Plant Physiology* 111: 755-763.
- KHIOOK ILK; SCHENEIDER C; HELOIR M-C; BOIS B; DAIRE X; ADRIAN M; TROUVELOT S (2013). Image analysis methods for assessment of H₂O₂ production and *Plasmopara viticola* development in grapevine leaves: Application to the evaluation of resistance to downy mildew. *Journal of Microbiological Methods*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.12>.
- KOVAKOU TH; TEGUO TW; VALLS J; KOUADIO YJ; DECENDIT A; MERILLON J-M (2006). First evidence of trans-resveratrol production in cell suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal* 86:405–409.
- KRAEVA E; TESNIERE C; TERRIER N; ROMIEL C; SAUVAGE FX; BIERNE J; DELOIRE A (1998). Transcription of a β-1,3-glucanase gene in grape berries in a late developmental period, or earlier after wounding treatments. *Vitis* 37(3): 107-111.
- KÚC J (2000). Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Protection* 19: 859-861.
- KUMAR J; GUPTA PK (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Report* 2: 93-112.
- LAMBERT C (2011). Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Doctorat del'Université Bordeaux, Segalen, 2011. 180 pp.
- LANGCAKE P (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ε-viniferin α-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* 18(2): 213-26.
- LAPLAZE L; GHERBI H; FRUTZ T; PAWLOWSKI K; FRANCHE C; MACHEIX J-J; AUGUY F; BOGUSZ D; DUHOUX E (1999). Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. *Plant Physiology* 121(1): 113-122.
- LAQUITAINE L; GOMÈS E; FRANCOIS J; MARCHIVE C; PASCAL S; HAMDÍ S; ATANASSOVA R; DELROT S; COUTOS-THÉVENOT P (2006). Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(10): 1103–1112.
- LARIGNON P; DUBOS B (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147-157.
- LARIGNON P; DUBOS B (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 184-189.
- LARIGNON P; FONTAINE F; FARINE S; CLÉMENT C; BERTCH C (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *C.R. Biologies* 332 : 765–783.
- LARIGNON P (2011). Les dépérissements liés aux *Botryosphaeriaceae*. In : Les maladies du bois de la vigne. Compte rendu des Journées nationales scientifiques Maladies du bois de la vigne. Villefranche-sur-Saône, 16-17 novembre 2010. 13-15.
- LARIGNON P (2012). Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes. <http://www.vignevin.com>.

- LARRONDE F; GAUDILLÉRE JP; KRISA S; DECENDIT A; DEFFIEUX G; MÉRILLON JM (2003). Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture*. 54(1):63-66.
- LEGAY G; MAROUF E; BERGER D; NEUHAUS J-M; MAUCH-MANI B; SLAUGHTERL A (2011). Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *European Journal of Plant Pathology* 129:281-301.
- LETOUSEY P.; BAILLIEUL F; PERROT G; RABENOELINA F; BOULAY M; VAILLANT-GAVEAU N; CLÉMENT C; FONTAINE F (2010). Early Events Prior to Visual Symptoms in the Apoplectic Form of Grapevine Esca Disease. *Phytopathology*, 100 (5): 424-431.
- LIMA MRM; FELGUEIRAS ML; GRCA G; RODRIGUES JEA; BARROS A; GIL AM; DIAS ACP (2010). NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany* 61(14): 4033-4042.
- LIMA MRM; DIAS ACP (2012). *Phaeomoniella chlamydospora*-induced oxidative burst in *Vitis vinifera* cell suspensions: role of NADPH Oxidase and Ca²⁺. *Journal of Phytopathology* 160: 129-134.
- LITTLE CR; MAGILL CW (2003). Elicitation of defense response genes in sorghum floral tissues infected by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata* at anthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 271-279.
- LIU L; DENNIS C; GITZ L; MCCLURE JW (1995). Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum* 93(4): 725.
- LIU F; WEI F; WANG L; LIU H; ZHU X; LIANG Y (2010). Riboflavin activates defense responses in tobacco and induces resistance against *Phytophthora parasitica* and *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(5-6): 330-336.
- LOPEZ-DELGADO H; DAT JF; FOYER CH; SCOTT IM (1998). Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*, 49(321): 713-720.
- LORENZO O; PIQUERAS R; SANCHEZ-SERRANO JJ; SOLANO R (2003). Ethylene response FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell* 15: 165-178.
- LORITO M; WOO SL; FERNANDEZ IG; COLUCCLI G; HARMAN GE; PINTOR-TORO JA; FILIPPONE E; MUCCIFORA S; LAWRENCE CB; ZOINA A; TUZUN S; SCALA F (1993). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7860-7865.
- LOZOVAYA VV; LIGYIN A; ZERNOVA OV; LI S; HARTMAN GL; WIDHOLM J (2004). Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 671-679.
- LUCERO G; CUCCHI N; PIZZUOLO P (2009). Enfermedades: Hongos y bacterias. En: Cucchi NJA y Becerra VC. Manual de tratamientos fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego. Sección III: VID- TomoI, 368pp.
- LYGIN AV; HILL CB; ZERNOVA OV; CRULL L; WIDHOLM JM; HARTMAN GL; LOZOVAYA VV (2010). Response of soybean pathogens to glyceollin. *Phytopathology* 100:897-903.
- MAHATMA MK; BHATNAGAR R; DHANDHUKIA P; THAKKAR VR (2009). Variation in metabolites constituent in leaves of downy mildew resistant and susceptible genotypes of pearl millet. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 249-255.
- MAJER P; HIDEG E (2012). Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a green-house. *Plant Physiology and Biochemistry* 50: 15-23.

- MALACARNE G; VRHOVSEK U; ZULINI L; CESTARO A; STEFANINI M; MATTIVI F; DELLEDONNE M; VELASCO R; MOSER C (2011). Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host-transcriptional responses. *BMC Plant Biology* 11: 114.
- MALDONADO AM; DOERNER P; DIXON RA; LAMB CJ; CAMERON RK (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399–403.
- MARTIN M; VESENTINI D; REGO C; MONTEIRO S; OLIVEIRA H; BOAVIDA FERREIRA RB (2009). *Phaeoemoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*. *Phytopathologia. Mediterranea* 48, 101–116.
- MARTIN DM; AUBOURG S; SCHOUWEY MB; DAVIET L; SCHALK M; TOUB O; LUND ST; BOHLMANN J (2010). Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays. *BMC Plant Biology* 10:226.
- MARTÍNEZ L (2005). Marcadores moleculares empleados para la identificación de variedades, clones y portainjertos de vid. *El vino y su industria* 4(35): 6-18.
- MARTÍNEZ DE TODA, F (1991). Biología de la vid. Fundamentos Biológicos de la viticultura. Ediciones Mundi-Prensa, 1991, Castelló, 37 Madrid, España. ISBN: 84-7114-313-5. 346 pp.
- MARTINS DOS SANTOS SOARES A; FREITAS DE SOUZA T; JANE DE SOUZA DOMINGUES S; JACINTO T; LIMA TAVARES MACHADO O (2004). Methyl jasmonate promotes the transient reduction of the levels of 2-cys peroxidase in *Ricinus communis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 543-547.
- MAUCH-MANI B; MÉTRAUX JP (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. *Annals of Botany* 82: 535-540.
- MAURÍN NAVARRO E (1967). Contribución al estudio de la Historia de la Vitivinicultura Argentina. Producción, Industria y Comercio de San Juan desde su fundación hasta principios del siglo XX. Mendoza, INV.
- MAZID M; KHAN TA; MOHAMMAD F (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3(2): 232-249.
- McDOWELL JM; DANGL JL (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Technical Tips on line* 25: 79-81.
- McNALLY DJ; WURMS KV; LABBÉ C; BELANGER RR (2003). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 293–303.
- MEDINA-BOLIVAR F; CONDORI J; RIMANDO AM; HUBSTENBERGER J; SHELTON K; O'KEEFE SF; BENNETT S; DOLAN MC (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68: 1991-2002.
- MERT-TÜRK F; BENNETT MH; MANSFIELD JW; HOLUB EB (2003). Camalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* following abiotic elicitation or inoculation with virulent or avirulent *Hyaloperonospora parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 137–145.
- MÉTRAUX J-P (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science* DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02313-0.
- MILLA TAPIA A; CABEZAS JA; CABELLO F; LACOMBE T; MARTINEZ-ZAPATER JM; HINRICHSIM P; CERVER HT (2007). Determining the Spanish origin of representative ancient American grapevine varieties. *American Journal of viticulture and Enologie* 58(2) 242-251.
- MILLI A; CECCONI D; BORTESI L; PERSI A; RINALDUCCI S; ZAMBONI A; ZOCCATELLI G; LOVATO A; ZOLLA L; POLVERARI A (2012). Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *Journal of proteomics* 75: 1284-1302.

- MOHAMED N; LHEMINIER J; FARMER M-J; FROMENTIN J; BÉNO N; HOUOT V; MILAT M-L; BLEIN J-P (2007). Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology* 97:611-620.
- MONTEIRO S; BARAKAT M; PICARRA-PEREIRA MA; TEIXEIRA AR; FERREIRA RB (2003). Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93(12): 1505-1511.
- MONTESANO M; BRADER G; PALVA ET (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* 4(1): 73-79.
- MORENO CA; CASTILLO F; GONZALEZ A; BERNAL D; JAIMES Y; CHAPARRO M; GONZALEZ C; RODRIGUEZ F; RESTREPO S; COTES AM (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 111–120.
- MOYO P; ALLSOPP E; ROETS F; MOSTERT L; HALLEEN F (2014). Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology* 104: 1063-1069.
- MUGNAI L, GRANITI A; SURICO G (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease* 83: 404-418.
- NAGEGOWDA DA; GUTENSOHN M; WILKERSON CG; DIDAREVA N (2008). Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *The Plant Journal* 55: 224–239.
- NAHAR K; KYNDT T; DE VLEESSCHAUWER D; HOFTE M; GHEYSEN G (2011). The Jasmonate Pathway is a key player in systemically induced defense against Root Knot Nematodes in Rice. *Plant Physiology*, 157: 305–316.
- NASCIMENTO T; REGO C; OLIVEIRA H (2007). Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia. Mediterranea* 46: 218–224.
- NIKFARDJAM MP; PATZ CD; KAUER R; SCHULTZ H; DIETRICH H (1999). A modified HPLC method to detect salicylic acid in must and wine after its application in the field to induce fungus resistance. *Vitis* 38(4): 179-182.
- NOOKARAJU A; AGRAWAL DC (2012). Enhanced tolerance of transgenic grapevines expressing chitinase and b-1,3-glucanase genes to downy mildew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111:15–28.
- NUÑEZ-PASTRANA R; ARCOS-ORTEGA GF; SOUZA-PERERA RA; SÁNCHEZ-BORGES CA; NAKAZAWA-UEJI YE; GARCÍA-VILLALOBOS FJ; GUZMÁN-ANTONIO A; ZUÑIGA-AGUILAR JJ (2011). Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology* 131:669–683.
- ORDEÑAMA KM (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 63: 22-32.
- OROZCO DE AMÉZQUITA M; GARCÉS DE GRANADA E; ARBELÁEZ-TORRES G (1997). Respuesta de variedades de clavel a la inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi y *Phialophora cinerescens*: producción de fitoalexinas. *Agronomía Colombiana* 15(1): 72-86.
- OROZCO-CÁRDENAS ML; NARVÁEZ-VÁSQUEZ J; RYAN CA (2001). Hydrogen Peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell* 13: 179–191.
- PAN Q-H; WANG L; LI J-M (2009). Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. *Plant Science* 176: 360–366.

- PARK SW; KAIMOYO E; KUMAR D; MOSHER S; KLESSIG DF (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318:113-116.
- PEARSON RC; GOHEEN AC (2001). Plagas y enfermedades de la vid. APS. Minnesota. USA. Traducción: de la Iglesia González. Mundi Prensa. Madrid. 91 pp.
- PERAZZOLI M; BAMPI F; FACCIN S; MOSER M; DE LUCA F; CICCOTTI AM; VELASCO R; GESSLER C; PERTOT I; MOSER C (2010). *Armillaria mellea* induces a set of defense genes in grapevine roots and one of them codifies a protein with antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(4): 485–49.
- PERAZZOLI M; DAGOSTIN S; FERRAI A; ELAD Y; PERTOT I (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* and benzotheadalazole. *Biological Control* 47: 228-234.
- PERRONE ST; McDONALD KL; SUTHERLAND MW; GUEST DI (2003). Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 127–135.
- PHILLIPS AJL (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3–18.
- PIETERSE CMJ; VAN LOON LC (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 4(2): 52-58.
- PIETERSE CMJ; LEON-REYES A; VAN DER ENT S; VAN WEES SCM (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- PLOMION C; LEPROVOST G; STOKES A (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiology* 127: 1513-1523.
- POLESANI M; DESARIO F; FERRARINI A; ZAMBONI A; PEZZOTTI M; KORTEKAMP A; POLVERARI A (2008). cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9: 142.
- POLESANI M; BORTESI L; FERRARINI A; ZAMBONI A; FASOLI M; ZADRA C; LOVATO A; PEZZOTTI M; DELLEDONNE M; POLVERARI A (2010). General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 18(11): 117.
- PONCIANO G; HIROMICH I; TSUYUMU S; LEACH JE (2003). Bacterial effectors in plant disease and defense keys to durable resistance. *Plant Disease* 87: 11.
- PONTIN M; PICCOLI PN; FRANCISCO R; BOTTINI R; MARTINEZ-ZAPATER JM; LIJAVETZKY D (2010). Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biology* 10:224.
- POTREBKO I; RESURRECCION AVA (2009). Effect of ultraviolet doses in combined ultraviolet-ultrasound treatments on trans-Resveratrol and trans-Piceid contents in sliced peanut kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7750–7756.
- POUZOLET J (2012). Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).
- PRATT C (1974). Vegetative anatomy of cultivated grapes – A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 25: 131-150.
- PROBS CM (2011). *Cylindrocarpum* Black Foot Disease in Grapevines. Identification and Epidemiology. <https://researcharchive.lincoln.ac.nz/bitstream/10182/3921/3/Probst PhD.pdf>. Lincoln University Thesis.

- PUNJA ZK (2001). Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 216-235.
- RAMMING DW; GABLER F; SMILANICK JL; MARGOSAN DA; CADLE-DAVIDSON M; BARBA P; MAHANIL S; FRENKEL O; MILGROOM MG; CADLE-DAVIDSON L (2012). Identification of race-specific resistance in North American *Vitis* spp. Limiting *Erysiphe necator* hyphal growth. *Phytopathology* 102 (1): 83-93.
- RECHE KVG; DE SOUZA GD; TRAPP MA; RODRIGUES-FILHO E; SILVA SC; FERNANDES JB; VIEIRA PC; MULLERC MW; DA SILVA MF das GF (2009). Methyl angolensate changes in *Khaya ivorensis* after fungal infection. *Phytochemistry* 70: 2027–2033.
- RENARD-MERLIER AD; RANDOUX B; NOWAK E; FARCY F.; DURAND R.; REIGNAULT P. (2007). Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68: 1156–1164.
- RENAULT AS; LETINOIS I; KRAEVA E; BIERNE J; DELOIRE A (1997). Grapevine infection with *Botrytis cinerea* results in synthesis of pathogenesis related proteins. 5th Conference internationale sur les maladies des plantes 3,4,5, Dic. ANPP5: 103.
- REPKA V (2002). A bestatin primes grapevine cells for augmented elicitation for the hypersensitive-like cell death and associated defense responses by methyl jasmonate. *Vitis* 41(2):69-76.
- REPKA V (2006). Early defence responses induced by two distinct elicitors derived from a *Botrytis cinerea* in grapevine leaves and cell suspensions. *Biologia Plantarum* 50 (1): 94-106.
- REPKA V; FISCHEROVÁ I (2001). New findings to the role of tunikamycin in grapevine: disease defense responses. *Vitis* 40(4): 169-174.
- REPKA V; FISCHEROVA I; SILHÁROVÁ K (2004). Methyl Jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevines leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum* 48(2): 273-283.
- ROBERT-SEILANIANZ A; GRANT M; JONES JDG (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just Jasmonate- Salicylate antagonism. *Annual Reviews of Phytopathology* 49:317–43.
- ROMANAZZI G; MUROLO S; FELIZIANI E (2013). Effects of an innovative strategy to contain grapevine Bois noir: Field treatment with resistance inducers. *Phytopathology* 103:785-791.
- ROTTER A; CAMPS C; LOHSE M; KAPPEL C; PILATI S; HREN M; STITT M; COUTOS-THÉVENOT P; MOSER C; USADEL B; DELROT S; GRUDEN K (2009). Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: Extending MapMan ontology for grapevine. *BMC Plant Biology* 9: 104.
- RYAN CA (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 112-121.
- SALLES II; BLOUN JW; DIXON RA; SCHUBERT TK (2002). Phytoalexin induction and β -1,3-glucanase activities in *Colletotrichum trifolli* infected leaves of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Physiological and Molecular Plant Physiology* 61: 89–101.
- SALGADO-SICLÁN ML (2012). Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis Doctorado en Ciencias. Campus Montecillo Postgrado de fitosanidad. Montecillo, Texcoco, México.
- SALZMAN RA, TIKHONOVA I, BORDELON BP, HASEGAWA PM, GRESSAN RA (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* 117(2): 465.
- SANZÓN GD; ZAVALETA ME (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 154-164.

- SANTOS C; FRAGOERIO S; OLIVEIRA H; PHILLIPS A (2006). Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeoconiella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. *Scientia Horticulturae* 107: 131–136.
- SCHENK PM; KAZAN K; WILSON I; ANDERSON JP; RICHMOND T; SOMERVILLE SC; MANNERS JM (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(21): 11655-11660.
- SCHMELZ EA; ENGELBERTH J; ALBORN HT; O'DONNELL P; SAMMONS M; TOSHIMA H; TUMLINSON JH (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(18): 10552–10557.
- SCHNEE S; VIRET O; GINDRO K (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 128–133.
- SCHNEE S; QUEIROZ EF; VOINESCO F; MARCOURT L; PIERRE-HENRI D; WOLFENDER J-L; GINDRO K (2013). *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 61: 5459-5467.
- SELMA MV; FREITAS PM; ALMELA L; GONZÁLEZ-BARRIO R; ESPÍN JC; SUSLOW T; TOMÁS-BARBERÁN F; GIL MI (2008). Ultraviolet-C and Induced Stilbenes Control Ochratoxigenic *Aspergillus* in Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9990–9996.
- SHAH J (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6:365–371.
- SHI X; BI J; MORSE JG; TOSCANO NC; COOKSEY DA (2013). Effect of xylem fluid from susceptible and resistant grapevines on developmental biology of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 135: 127-135.
- SHIGO AL (1985). Compartmentalization of decay in trees. *Scientific American* 252: 96-103.
- SHIRAIISHI M; CHIJIWA H; FUJISHIMA H; MURAMOTO K (2010). Resveratrol production potential of grape flowers and green berries to screen genotypes for gray mold and powdery mildew resistance. *Euphytica* 176: 371-381.
- SIDDIQUI IA; SHAUKAT SS (2004). Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology* 152(1): 48.
- SLAUGHTER AR; HAMIDUZZAMAN MM; GINDRO K; NEUHAUS J-M; MAUCH-MANI B (2008). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* 122:185–195.
- SOSNOWSKI M; CREASER ML; WICKS TJ; LARDNER R; SCOTT ES (2008). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14(2): 134-142.
- SOSNOWSKI M; LOSCHIAVO A; WICKS T; SCOTT E (2009). Managing eutypa dieback in grapevines. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker Annual Technical Issue*: 13-16.
- SORIA-GUERRA RE; ROSALES-MENDOZA S; CHANG S; HAUDENSHIELD JS; ZHENG D; RAO SS; HARTMAN GL; GHABRIAL SA; KORBAN SS (2010). Identifying differentially expressed genes in leaves of *Glycine tomentella* in the presence of the fungal pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Planta* 232: 1181-1189.
- SPENCER M; RYU C-M; YANG K-Y; KIM YC; KLOEPPER JW; ANDERSON AJ (2003). Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 involves at least the ethylene pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 27–34.

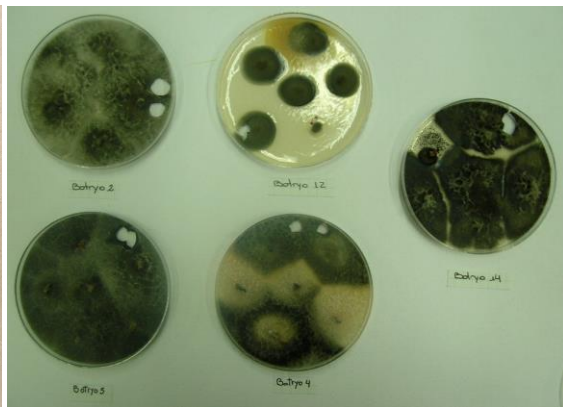
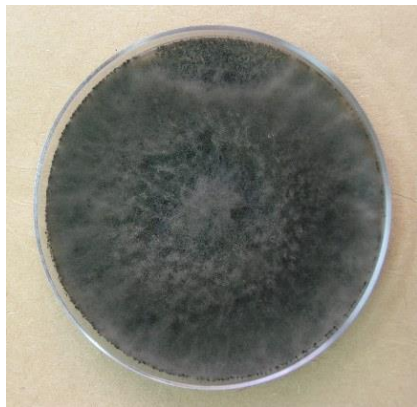
- STAHL EA; BISHOP JG (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 299-304.
- STEIMETZ E; TROUVELOT S; GINDRO K; BORDIER A; POINSSOT B; ADRIAN M; DAIRE X (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 89-95.
- STUIVER MH; CUSTERS JHHV (2001). Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411:865-868.
- SUN Q; GREVE LC; LABAVITCH JM (2011). Polysaccharide compositions of intervessel pit membranes contribute to Pierce's disease resistance of grapevines. *Plant Physiology*, 155: 1976–1987.
- SUN Q, ROST TL; REID MS; MATTHEWS MA (2007). Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. *Plant Physiology* 145: 1629–1636.
- TASSONI A; DURANTE L; FERRI M (2012). Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 169: 775-781.
- THALER JS; OWEN B; HIGGINS VJ (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135: 530-538.
- THOLL D (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9:297–304.
- THOMMA BPHJ; EGGERMONT K; PENNINGCKX IAMA; MAUCH-MANI B; VOGELSANG R; CAMMUE BPA; BROEKAERT W (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15107-15111.
- THOMMA BPHJ; TIERENS KFM; PENNINGCKX IAMA; MAUCH-MANI B; BROEKAERT WF; CAMMUE BPA (2001). Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 673–680.
- TISCHNER R; KOLTERMANN M; HESSE H; PLATH M (2010). Early responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Verticillium longisporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 419-427.
- TON J; MAUCH-MANI B (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal* 38: 119-130.
- TROCCOLI L; CALAMASSI B; MORI B; MUGNAI L; SURICO G (2001). *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathologia mediterranea* 40: S400-S406.
- TROTEL-AZIZ P; COUDERCHET M; VERNET G; AZIZ A (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 114:405–413.
- TROUVELOT S; VARNIER AL; ALLÉGRE M; MERCIER L; BAILLIEUL F; ARNOULD C; GIANINAZZI-PEARSON V; KLARZYNSKY O; JOUBERT JM; PUGIN A; DAIRE X (2008). A beta-1.3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 232-243.
- TURNER JG; ELLIS C; DEVOTO A (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* 14: S153-S164.
- VALTAUD C; FOYER CH; FLEURAT-LESSARD PF; BOURBOULOUX A (2009). Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by Esca infection in grapevines. *Functional Plant Biology* 36: 260–279.
- VITORIA ER; ALCALDE LASALLE AJ (1949). El arrugamiento viroso de la vid. Ministerio de Agricultura. Argentina. *Revista De Investigaciones Agrícolas* 3 (1): 1-26.

- VAN DER ENT S; KOORNNEEF A; PIETERSE TJ (2008). Induced resistance-orchestrating defence mechanisms through cross-talk and priming. In: Annual Plant Reviews-Molecular Aspects of Plant Disease Resistance, 34. J.E. Parker (Ed). Wiley-Blackwell: 334-370.
- VAN DER ENT S; VAN WESS SCM; PIETERSE CMJ (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
- VAN ETTEN HD; MANSFIELD JW; BAILEY JA; FARMER EE (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *The Plant Cell*, September: 1191-1192.
- VAN NIEKERK JM; FOURIE PH; HALLEEN F; CROUS PW (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 45, S43–S54.
- VERHAGEN BWM; TROTEL-AZIZ P; COUDERCHET M; HOFTE M; AZIZ AZIZ L (2010). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botanic* 61(1): 249-260.
- VERHAGEN BWM; TROTEL-AZIZ P; JEANDET P; BAILLIEUL F; AZIZ A (2011). Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology* 101:768-777.
- VERONESE P; RUIZ MT; COCA MA; HERNANDEZ-LOPEZ A; LEE H; IBEAS JI; DAMSZ B; PARDO JM; HASEGAWA PM; BRESSAN RA; NARASIMHAN ML (2003). In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology* 131: 1580-1590.
- VIDAL JR; KIKKERT JR; MALNOY MA; WALLACE PG; BARNARD J; REISCH BL (2009). Evaluation of transgenic “Chardonnay” (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Research* 15(1): 69-82.
- VIJAYAN P; SHOCKEY J; LÉVESQUE CA; COOK RJ; BROWSE J (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7209-7214.
- VITALINI S (2012). Effect of SAR inducers on grape secondary metabolites. Doctoral Course in Biologia Vegetale e Produttività della Pianta Coltivata Ciclo XXIV. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO, 93pp.
- WAKEFIELD L; GADOURY DM; SEEM RC; MILGROOM MG; SUN Q; CADLE-DAVIDSON L (2011). Differential gene expression during conidiation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *Phytopathology* 101: 839-846.
- WALTERS DR; FOUNTAINE JM (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science* 147: 523-535.
- WANG W; TANG K; YANG H-R; WEN P-F; ZHANG P; WANG H-L; HUANG W-D (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 142-152.
- WEGENER CB (2002). Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by endogenous pectate lyase in potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 91–100.
- WILLIAMS JS; COOPER RM (2003). Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 3–16.
- WINKEL-SHIRLEY B (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493.
- WU J; ZHANG Y; ZHANG H; HUANG H; FOLTA KM; LU J (2010). Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biology* 10:234.

- ZHANG S; REDDY MS; KOKALIS-BURELLE N; WELLS LW; NIGHTENGALE SP; KLOEPPER JW (2001). Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting Rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Disease* 85(8): 879-884.
- ZHANG W; CURTIN C; KIKUCHI M; FRANCO C (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468.
- ZHANG WJ; BJORN LO (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* 80: 207–218.
- ZHENG Z; UCHACZ TM; TAYLOR JL (2001). Isolation and characterization of novel defence-related genes induced by copper, salicylic acid, methyl jasmonate, abscisic acid and pathogen infection in *Brassica carinata*. *Molecular Plant Pathology* 2(3): 159.

CAPÍTULO II.

Caracterización de aislamientos argentinos de hongos de la familia Botryosphaeriaceae



2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Hospederos y síntomas de especies de la familia *Botryosphaeriaceae*.

La familia *Botryosphaeriaceae* incluye géneros y especies de distribución cosmopolita, en zonas de clima templado y tropical (Jacobs y Rehner, 1998). Representa un grupo diverso de hongos ascomicetes, que colonizan especies leñosas de interés forestal así como árboles frutales de importancia económica mundial, comportándose como endófitos, saprófitos o patógenos oportunistas (Abdollahzadeh *et al.*, 2013; Pavlic *et al.*, 2004; Twizeyimana *et al.*, 2013).

Entre las numerosas especies leñosas de interés forestal en las que se han descrito especies de *Botryosphaeriaceae* responsables de canchros y muerte de ramas, se cita a **coníferas** (Alves *et al.*, 2013; Bihon *et al.*, 2010; De wet *et al.*, 2008; Golzar y Burgess, 2011; Luchi *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2005b), **eucaliptos** (Chen *et al.*, 2011; Mohali *et al.*, 2007; Pavlic *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2010; Slippers *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2009), **robles** (Alves *et al.*, 2004; Lynch *et al.* 2013), **álamos** (Phillips, 2000), **acacias** (Jami *et al.*, 2012a,b, 2013) y **catalpas** (Begoude *et al.*, 2010).

En frutales, también se encuentran especies de *Botryosphaeriaceae* causantes de canchros, gomosis y muerte de ramas. Se citan en **durazneros** (Damm *et al.*, 2007; Eskalen *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2007; Thomidis *et al.*, 2011), **perales** (Shah *et al.*, 2010), **almendros** (Eskalen *et al.*, 2013; Inderbitzin *et al.*, 2010) y **manzanos** (Phillips *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2010). También, producen daños y pérdidas económicas en **kiwis** (Pennycook y Sammuels, 1993), **papayas** (Netto *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014); **mangos** (Batista *et al.*, 2012; Ismail *et al.*, 2013a,b; Marques *et al.*, 2013; Slippers *et al.*, 2007a,b; Sakalidis *et al.*, 2011a,b,c,d), **cítricos** (Adesemoye *et al.*, 2010; Adesemoye y Eskalen, 2011; Eskalen *et al.*, 2013;), **paltos** (Eskalen *et al.*, 2013; Twizeyimana *et al.*, 2013); **frutillas** (Espinosa *et al.*, 2009); **pistachos** (Latorre *et al.*, 2012; Ma y Michailides, 2002; Wunderlich *et al.*, 2012), **arándanos** (Espinoza *et al.*, 2009; Latorre *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2006; Sammonds *et al.*, 2009), **nogales** (Crous *et al.*, 2007) y **olivivos** (Moral *et al.*, 2008; Latinovic *et al.*, 2013; Lazzizera *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2012).

En la última década, especies de *Botryosphaeriaceae* han ganado reconocimiento como patógenos de la madera y han sido reportadas como causa principal del decaimiento de vides en **Australia** (Epstein *et al.*, 2009; Pitt *et al.*, 2013,b; Qiu *et al.*, 2011; Savocchia *et al.*, 2007; Trouillas *et al.*, 2011; Whitelaw Weckert *et al.*, 2013; Wunderlich *et al.*, 2011), **Sudáfrica** (Van Niekerk *et al.*, 2006, 2010), **Nueva Zelanda** (Amponsah *et al.*, 2009; Baskarathevan *et al.*, 2012a,b; Billones-Baaijens *et al.*, 2013b,c; Bonfiglioli y Gregor, 2006;), **Portugal** (Sofía *et al.*, 2013), **China** (Yan *et al.*, 2013), **España** (Aroca *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2014; Martin y Cobos, 2007; Martin *et al.*, 2011; Moreno-Sanz *et al.*, 2013), **Iran** (Mohammadi *et al.*, 2013), **Croacia** (Kaliterna *et al.*, 2013), **Francia** (Fussler *et al.*, 2008, Kuntzmann *et al.*, 2010, Larignon *et al.*, 2012), **Italia** (Burruano *et al.*, 2008, Chebil *et al.*, 2013; Linaldeddu *et al.*, 2010, Mondello *et al.*, 2013 y

también ha sido aislada frecuentemente en **México** (Candolfi-Arbello *et al.*, 2011, Urbez-Torres *et al.*, 2008), **Chile** (Bessoín *et al.*, 2013, Díaz *et al.*, 2013), **Brasil** (Correia *et al.*, 2013;), **Uruguay** (Abreo *et al.*, 2013), **Estados Unidos** (Baumgartner *et al.*, 2013; Eskalen *et al.*, 2013; Michailides *et al.*, 2012, Pintos *et al.*, 2011; Spagnolo *et al.*, 2011; Urbez-Torres *et al.*, 2006, 2007, 2009) y **Canadá** (Urbez-Torres *et al.*, 2013).

En general, los síntomas producidos comprenden: debilitamiento y muerte de brotes, crecimiento reducido, clorosis, decaimiento y muerte de brazos de la cepa a largo plazo. También se citan mortalidad de yemas (Andreini *et al.*, 2013) y lesiones en las flores, racimos y bayas (Larignon y Dubos, 2001; Leavitt, 2003; Spagnolo *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2013). Además, se producen canchales y distintas necrosis internas en la madera, generalmente sectoriales en forma de V en corte transversal y un estriado negro longitudinal alrededor de la médula. Se mencionan, además, como causantes de la unión incompleta de injerto. El desarrollo de los síntomas es lento, conduce a la reducción de vigor y producción y se acrecientan en condiciones de estrés o daños mecánicos (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a,b; Amponsah *et al.*, 2009, 2011; Baskarathevan, 2012; Berstch *et al.*, 2013; Bessoín *et al.*, 2013; Chebil *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2013; Eskalen *et al.*, 2013; Fourie y Hallen, 2004; Gimenez-Jaime *et al.*, 2006; Gubler *et al.*, 2005; Larignon, 2010, 2011; 2012; Larignon and Dubos, 2001b; Larignon *et al.*, 2009; Lehoczky, 1974; Linaldeddu, 2010; Luque *et al.*, 2005; Magnin-Robert *et al.*, 2011; Phillips, 2002; Savocchia *et al.*, 2007; Stanosz *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Urbez-Torres *et al.*, 2006a, 2007; Urbez-Torres y Gubler, 2009; Van Niekerk *et al.*, 2004, 2006; Von Arx, 1987).

Si bien, existe un conjunto de hongos asociados a las enfermedades de madera, especies de *Botryosphaeriaceae* son frecuentes en campo afectando a la vid, tienen una dispersión aérea y penetran principalmente por las heridas producidas en la poda (Luque *et al.*, 2014; Mugnai *et al.*, 1999; Rolshausen *et al.*, 2011; Surico *et al.*, 2006; Van Niekerk *et al.*, 2006). Recientes investigaciones han destacado el papel que el material vegetal producido en viveros puede tener sobre su incidencia y diseminación y evalúan potenciales puntos de infección, durante la producción de plantas (Agustí-Brisach *et al.*, 2014; Aroca *et al.*, 2010; Billones-Baaijens *et al.*, 2013 a,b; Gramaje y Armengol, 2011).

En Argentina, se obtuvieron a partir de vides con hoja de malvón, colonias de *Botryosphaeriaceae* que correspondieron a los hongos de mayor frecuencia de aparición, junto con *I. jamaisensis*. Inclusive, especies de esta familia fúngica, mostraron los mayores valores de frecuencia de aislamiento en plantas jóvenes con decaimiento y necrosis en madera. A propósito, los ensayos de su patogenicidad *in vitro* y a campo resultaron positivos (Gatica *et al.*, 2000). Sin embargo, la diferenciación de géneros no está totalmente dilucidada, requiriendo su identificación molecular a nivel de especie. En este capítulo se presentan y discuten nuevos estudios morfológicos, culturales y moleculares en especies de *Botryosphaeriaceae* obtenidos en zonas vitícolas argentinas.

2.1.2. Taxonomía de *Botryosphaeriaceae*

El género *Botryosphaeria* Ces & De Not. se clasifica dentro de los *Ascomycetes*, en la clase *Dothideomycetes*, Orden *Botryosphaeriales* y Familia *Botryosphaeriaceae* (Hawksworth *et al.*, 2011; Kirk *et al.*, 2008; Schoch *et al.*, 2006). Este género fue propuesto en 1863, por De Cesati y de Notaris y fue luego rectificado por Saccardo, (1877), utilizando como especie tipo a *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. (Denman *et al.*, 2000).

La taxonomía del género y las especies en esta familia ha sido inconsistente, permaneciendo confusa por mucho tiempo. Estudios de Slippers *et al.*, (2004) reportaron que los caracteres sexuales (teleomorfos) difieren en los distintos hospederos y no son distintivos a nivel de especie y, la resolución de las técnicas moleculares que han conducido a la reclasificación de algunas especies y descripción de nuevas (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2002a,b, 2008, 2013; Slippers *et al.*, 2004 a,b,c,d), han aumentado las dificultades en la identificación de hongos de este género.

Phillips *et al.*, (2013) presentaron las más recientes descripciones detalladas de la familia *Botryosphaeriaceae* en plantas leñosas. Asimismo, el Dr. Phillips, de la Universidad Nova de Lisboa (Portugal) desarrolló una página web, que incluye descriptores morfológicos y citas bibliográficas: <http://crem.fct.unl.pt/botryosphaeriasite>.

Estos hongos presentan una fase sexual (teleomórfica) escasa en la naturaleza y una fase asexual (anamórfica) abundante. La **forma sexual** de estas especies de *Dothideomycetes*, se caracteriza por formar ascos bitunicados (con doble pared) en el interior de lóculos estromáticos o ascocarpos. Las especies del género *Botryosphaeria*, desarrollan micelio gris-verdoso en el interior del tejido vegetal y ascocarpos oscuros dispersos. Durante la maduración, lesionan el tejido vegetal produciendo pseudotecios que contienen a los ascocarpos, y en su interior se sitúan ascos conteniendo ocho ascosporas, de aspecto hialino, forma elipsoide u ovoide, generalmente aseptadas con la parte central más gruesa, a veces con una o dos septas (Slippers *et al.*, 2004a; Crous *et al.*, 2006; Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2005a,b). Los teleomorfos de éste género, tienen también la capacidad de formar pequeñas células sexuales llamadas espermacias, que son transportadas por insectos, agua o viento y son responsables de la aparición de los estados teleomórficos (ascocarpos) cuando entran en contacto con hifas receptoras. Para que la espermatización tenga lugar, son necesarios dos talos fúngicos sexualmente compatibles, lo que, a menudo, dificulta la aparición del estado teleomórfico. Por este motivo, las especies pertenecientes al género *Botryosphaeria* se aíslan muy difícilmente en el medio natural, en su estado teleomórfico y, además, las características de los teleomorfos varían muy poco entre las diferentes especies.

Los conidios de *Botryosphaeriaceae*, presentan una variación considerable entre géneros y especies. Por todo esto, las identificaciones se realizan según las características de su estado anamórfico (Crous *et al.*, 2006; Denman *et al.*, 2000; Jacobs y Rehner, 1998).

En la década pasada, se han definido cambios sustanciales en la definición de géneros sexuales y asexuales relacionados con *Botryosphaeriaceae* (Crous *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2008). Numerosos estudios corroboraron la división de especies en dos únicos géneros anamórficos: tipo-*Diplodia*, de conidios elipsoidales pigmentados con paredes gruesas, aseptados o con una septa, de >10 µm de ancho y el tipo-*Fusicoccum*, de conidios fusiformes hialinos, paredes delgadas y normalmente sin septa, y de <10 µm de ancho (Phillips, 2002; Phillips *et al.*, 2013; Denman *et al.*, 2000, Alves *et al.*, 2004, Slippers *et al.*, 2004a; van Niekerk *et al.*, 2004; Zhou y Stanosz, 2001). Posteriormente, han surgido nuevos géneros y según las nuevas metodologías de análisis molecular, los géneros anamorfo que actualmente se consideran en vid, son: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* (Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2005; Pavlic *et al.*, 2008, 2009a,b; Crous *et al.*, 2006).

La identificación de anamorfo, teleomorfo y su correspondiente relación se basa tanto en las características morfológicas como en la secuenciación de su ADN (Slippers *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2007b).

La utilización de la nomenclatura “*Botryosphaeria*” no es taxonómicamente correcta, para hacer referencia a los géneros similares entre sí, que incluyen *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y otros, cuya forma sexual se describe como *Botryosphaeria*. Actualmente, se utiliza el nombre del anamorfo como nombre válido para la especie, independientemente de si se conoce la forma sexual o no (Phillips *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2008). Esta convención ha sido aplicada desde los cambios introducidos por Crous *et al.*, 2006 y es consistente con las recientes decisiones de inhabilitar el sistema de nomenclatura dual para la taxonomía de hongos (Hawksworth *et al.*, 2011; Wingfield *et al.*, 2012).

2.1.3. Biología de *Botryosphaeriaceae*

Los miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* producen esporas en dos tipos de cuerpos fructíferos llamados peritecios (ascosporas) y picnidios (conidios), representando los estados teleomórfico (sólo en los casos en los que aparecen) y anamórfico del hongo, respectivamente (Eskalen *et al.*, 2013). El estado asexual (anamorfo) es el comunmente observado en la naturaleza (Jacobs *et al.*, 2008). Los mismos, se encuentran localizados sobre la corteza, las heridas de poda y pueden sobrevivir como saprófitos en la madera muerta, en el suelo. Kuntzmann *et al.*, (2010) confirmaron en Francia, que los conidios asexuales, son diseminados durante el período vegetativo de la vid, en condiciones húmedas y lluviosas. Penetran a la vid por las heridas de poda o el injerto y colonizan la madera permaneciendo en estado endófito o patógeno latente. Asimismo, se transmiten durante la multiplicación de plantas cuando se utiliza material madre contaminado (Gramaje y Armengol, 2011).

2.1.4. Características morfológicas de *Botryosphaeriaceae*

En la familia *Botryosphaeriaceae*, la morfología del estado teleomórfico difiere muy poco entre especies, es un estado escaso en la naturaleza y no se pueden obtener en cultivo artificial. Por el contrario, se ha determinado un amplio rango dentro de los anamorfos y es en este estado, en que se realizan las identificaciones.

De forma generalizada las especies presentan un crecimiento rápido en medio de cultivo (5 a 10 mm día⁻¹). El micelio presenta inicialmente una coloración blanquecina que rápidamente adquiere una tonalidad grisácea conformando un micelio aéreo denso.

La caracterización de especies se basa en la morfología de las colonias y en el tamaño, color, septación y textura de los conidios (Jacobs y Rehner, 1998; Pennycook and Samuels, 1985; Denman *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001). Además, el uso de la tasa de crecimiento miceliar a diferentes temperaturas y a la temperatura óptima complementan efectivamente la identificación de especies (Alves *et al.*, 2006a,b; Crous *et al.*, 2006; Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2002; Slippers *et al.*, 2004a,b).

Esta familia se caracteriza por: Ascomata uni a multilocular con paredes castañas, en multicapas, aislados o en grupos e incrustados en tejido estromático. Ascosporas bitunicadas, de paredes gruesas, clavados, pediceladas o sésiles, con una cámara apical muy desarrollada. Presencia de pseudoparáfisis hialinos, septados, ramificados o no. Ascosporas hialinas o pigmentadas, septadas o no, elipsoides a ovoides, con o sin apéndices mucoides.

Los anamorfos presentan conidiomata picnidial uni a multilocular, incrustado en tejido estromático, células conidiogénicas hialinas, fialídicas. Conidios hialinos o pigmentados, septados o aseptados, de paredes delgadas o gruesas (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Crous *et al.*, 2006; Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2008).

2.1.5. Identificación molecular de *Botryosphaeriaceae*

La producción de picnidios y conidios en medio de cultivo artificial no es factible en algunas especies y los caracteres morfológicos pueden estar sometidos a la subjetividad de quien los analiza, no ser apreciables a simple vista o bien, las homologías no se pueden definir inequívocamente, en consecuencia, la identificación resulta laboriosa, requiere amplia experiencia y no siempre es exitosa. La insuficiente resolución taxonómica asociada al efecto del medio ambiente en la expresión génica y cierto grado de subjetividad en el criterio del investigador en los métodos morfológicos, han propiciado el uso de técnicas moleculares.

Las técnicas más utilizadas en la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas de *Botryosphaeriaceae*, y que han facilitado de gran manera los estudios moleculares en todos los ámbitos científicos, son los marcadores bioquímicos como las isoenzimas y marcadores basados en

el ácido desoxiribonucleico (ADN) como los basados en la reacción en cadena de la polimerasa **PCR** (polymerase chain reaction), que a través de ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación de cebadores con cadenas opuestas del ADN de la muestra y la extensión, se produce una acumulación exponencial del fragmento de ADN blanco (De la Fuente, 2009), **PCR anidada** (Billones-Baaijens, 2011), los **RAPDs** (Random Amplified Polymorphic DNA = Polimorfismo de ADN amplificado por cebadores arbitrarios) (De Wet *et al.*, 2000, 2008a,b; Stanosz *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2001), **SSR** (Simple Sequence Repeats = Secuencias simples repetidas = microsatélites) (Ma *et al.*, 2001; Bihon *et al.*, 2010; de Wet *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2010) y **AFLPs** (Amplified Fragment Length Polymorphisms = Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos Amplificados) (Alves *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Gezahgne *et al.*, 2004; Martin y Cobos 2007; Piskur *et al.*, 2012; Slippers *et al.*, 2004; Pavlic *et al.*, 2007). Otra de las técnicas más frecuentes, que suele aplicarse cuando los métodos moleculares de amplificación por PCR no detectan polimorfismo, es el secuenciado directo del producto amplificado por PCR y el análisis comparativo de **secuencias** nucleotídicas de genes o regiones de ADN mitocondrial, nuclear y ARN ribosomal en bases de datos GenBank y/o EMBL.

La combinación de características culturales y los datos moleculares, definen claramente la diferencia entre especies de *Botryosphaeriaceae* aisladas de vides con síntomas (Amponsah *et al.*, 2009; Besoain *et al.*, 2013; Fischer y Kassemeyer, 2003; Martin y Cobos, 2007; Linaldeddu *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2006, 2007).

Son muchos los genes y regiones estudiadas hasta el momento y **el espaciador interno transcripto (ITS) del ADN ribosomal (ADNr) completo**, de 600 a 800 pb (Figura 2.1), se ha seleccionado como “el código de barras” del genoma de los hongos (Schoch *et al.*, 2012). El mismo, puede amplificarse fácilmente con cebadores universales (Alves *et al.*, 2004; Denman *et al.*, 2003; Farr *et al.*, 2005; Flowers *et al.*, 2003; Glen *et al.*, 2007; Gure *et al.*, 2005; Inderbitzin *et al.*, 2010; Ma y Michailides, 2002; Mohali *et al.*, 2007; Mehl *et al.*, 2011; Oliveira-Costa *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2002, 2007; Pavlic *et al.*, 2007; Piskur *et al.*, 2012). La principal razón para ello se encuentra en que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas repetidas en tándem. La región del ADN ribosómico incluye el gen 18S (región denominada SSU), el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (denominado LSU) que son conservadas y muestran baja variabilidad (Figura 2.1).

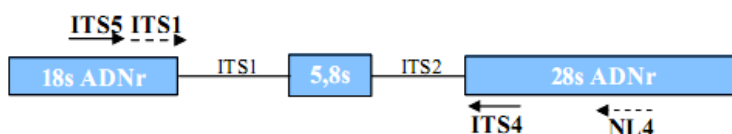


Figura 2.1. Esquema de una unidad de ADNr y localización de los iniciadores universales ITS4, ITS1 y NL4 utilizados (Slippers *et al.*, 2004a).

Se reportan numerosos estudios que han estudiado especies de *Botryosphaeriaceae* empleando la región ITS del ADN ribosomal: Chebil *et al.* (2013) identificaron aislamientos de *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* y de *Neofusicoccum luteum* en vides de dos a cinco años, con síntomas de declinamiento y canchales, provenientes de Tunisia, África; Ammad *et al.* (2014) identificaron *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum* en vides con declinamiento en Algeria; recientemente, Yan *et al.* (2013) identificaron *B. dothidea*, *D. seriata*, *Lasiodyplodia theobromae* y *N. parvum*, en vides con síntomas en China; Baskarathevan *et al.* (2012b) identificaron especies utilizando análisis PCR-RFLP de la región ITS (*N. parvum*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. ribis*, *D. mutila*, *D. seriata*, *B. dothidea*, *Dothiorella ibérica* y *Dothiorella sarmentorum*) para determinar la incidencia y distribución de *Botryosphaeriaceae* en vides con declinamiento de Nueva Zelanda y Linaldeddu *et al.* (2014) estudiaron la diversidad de especies asociadas con el declinamiento de vides en viñedos de Sardinia, Italia e identificaron *D. seriata* y *N. parvum*. Incluso, *D. olivarum* y *D. africana* fueron reportadas por primera vez en vid y describieron una nueva especie en vid: *Lasiodyplodia mediterránea*. En el vecino país de Chile, se han estudiado especies de *Botryosphaeriaceae* produciendo canchales en vides de vinificar y vides para uva de consumo en fresco. Besoain *et al.* (2013), identificaron a partir del análisis de la región ITS del ADN ribosomal, en conjunto con el análisis de la subunidad 2 de la sección β -tubulina, razas de *N. australe* patógenas de madera, en vides cv. Cabernet Sauvignon procedentes de viñedos de la zona central de Chile, de 5 a 19 años, con síntomas de entrenudos cortos, muerte de brazos y necrosis sectoriales en tronco. Asimismo, Díaz *et al.* (2011b) identificaron aislamientos de *N. parvum*, en vides de cvs. Cabernet Sauvignon, Carménere, Red Globe, Syrah y Thompson Seedless con declinamiento y necrosis sectoriales en la madera en viñedos localizados en los valles de Maipo y Colchagua. En Perú, Rodríguez-Gálvez *et al.* (2015), aislaron e identificaron a *L. theobromae*, a partir de plantas cv. Red Globe de viñedos de las regiones de Piura y Chira, con síntomas de decaimiento y necrosis características.

También, se han estudiado genes estructurales que codifican para proteínas, como la **β -tubulina, el factor de elongación (EF-1 α), la región D1/D2 del ADN ribosomal (NL4)**, entre otros (Abdollahzadeh *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2004; Denman *et al.*, 2003; Damm *et al.*, 2007; Glen *et al.*, 2007; Inderbitzin *et al.*, 2010; Lazzizzera *et al.*, 2008; Marincowitz *et al.*, 2008; Michailides *et al.*, 2010; Mehl *et al.*, 2011; Mohali *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2000; Oliveira-Costa *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2005, 2006, 2008; Sakalidis *et al.*, 2011; Smith y Stanosz, 2006; Slippers *et al.*, 2004a,b, 2007, 2005). En 2013, Mohammadi y colaboradores, identificaron las especies *D. seriata* y *N. parvum* en vides con síntomas de declinamiento ubicadas en distintas provincias de Iran. Igualmente, Akgul *et al.* (2014) identificaron *B. dothidea*, *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. parvum* en vides afectadas de la región Aegean, al oeste de Turquía.

Para determinar la diversidad genética de *Botryosphaeriaceae*, se efectúa principalmente el análisis de **marcadores RAPDs** y **secuenciación de ADN en la region ITS ribosomal** (Amponsah *et al.*, 2009; Besoain *et al.*, 2013; Crous *et al.*, 2006; Denman *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2013; Fischer y Kassemeyer, 2003; Linaldeddu *et al.*, 2010; Luque *et al.*, 2005; Martin y Cobos, 2007; Phillips *et al.*, 2002, 2008; Qiu *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2004a, 2007; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006, 2007b). En estos estudios se amplifican regiones ITS, por medio de la reacción PCR para luego ser tratados con endonucleasas de restricción que generan fragmentos de ADN de distinto tamaño logrando patrones específicos. En Italia, Mondello *et al.* (2013), aislaron especies de *Botryosphaeriaceae*, a partir de vides de los cvs. Insolia, Merlot, Grillo y Alicante Bouchet, que presentaban síntomas de declinamiento y posteriormente, obtuvieron perfiles ITS-RFLP al digerir amplificaciones por PCR, con las enzimas *CfoI* y *HaeIII* e identificaron *D. seriata*, *Lasiodiplodia* sp., *N. parvum* y *N. vitifusiforme*. Igualmente, a partir de vides afectadas de viñedos de Nueva Zelanda, Baskarathevan *et al.* (2012) confirmaron la identificación morfológica de *D. mutila* y *D. seriata*, con la restricción del ADN amplificado de la región ITS, utilizando las endonucleasas *AsuI* y *NcoI*, respectivamente. Además, los resultados obtenidos distinguieron entre *N. luteum* y *N. australe*, como también *N. parvum* y *N. ribis* utilizando las enzimas *SacII*, *MspI*, respectivamente. Abreo *et al.* (2013) identificaron a través de perfiles ITS-RFLP, *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. luteum*, *L. theobromae* y *N. australe* obtenidas de vides con síntomas de viñedos uruguayos.

Dado que los estudios de polimorfismo requieren del análisis de un gran número de individuos, el empleo de estas técnicas requiere la extracción de ADN en calidad adecuada y cantidad suficiente, de forma rápida. Numerosos métodos han sido propuestos, sin embargo los mismos no ofrecen igual rendimiento en cantidad y pureza al emplearlos en tejidos fúngicos, por la presencia de contaminantes propios de estas especies por lo que en el presente capítulo se desarrolla un método sencillo, rápido y de alto rendimiento en la extracción de ADN. Posteriormente, se identificarán los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* asociados a vides con hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes combinando estudios morfológicos, culturales y datos moleculares.

Conocer las especies causantes de decaimiento de vides en Argentina, su diversidad genética y la respuesta de distintas variedades de vid, eficientizarán programas de mejoramiento de cultivares tolerantes a las enfermedades de madera.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Hipótesis 1: Especies de *Botryosphaeriaceae* integran una comunidad y están comúnmente diseminadas en los viñedos de las distintas regiones agroclimáticas argentinas donde se realiza el cultivo de la vid, causando decaimiento y muerte de plantas.

Objetivo 1: Aislar y purificar aislamientos de *Botryosphaeriaceae* procedentes de vides con síntomas de enfermedades fúngicas de madera de distintas zonas vitícolas argentinas.

2.2.1. Material fúngico

Relevamiento de muestras y obtención de aislamientos fúngicos

Durante 2000-2011, se muestrearon plantas de vid con síntomas de hoja de malvón y decaimiento, de las principales provincias productoras del país: Mendoza (65 plantas) en sus oasis norte, este, sur, centro y Valle de Uco; San Juan (8 plantas), La Rioja (6 plantas), Catamarca (15 plantas), Salta (6 plantas) y Rio Negro (3 plantas) (Tablas 2.1 y 2.2). Se recolectaron plantas con síntomas externos en hojas y brotes, además de necrosis en la madera. Las extracciones de vides, a campo, se realizaron entre diciembre y febrero, cuando los síntomas fueron más evidentes.

De acuerdo a la metodología de Larignon y Dubos (1997), se realizaron en laboratorio, observaciones macro y microscópicas a partir de madera con síntomas y se llevaron a cabo cortes longitudinales y transversales de raíces, troncos, brazos y tallos en función de la edad y tipología de la planta, en busca de necrosis características de las enfermedades de la madera. En plantas de > 11 años, se analizaron raíces, base de la planta, tronco, bifurcación de brazos y brazos. En plantas de ≤ 10 años, se examinaron raíces, base del pie de injerto, zona de pie, zona de unión de injerto y tallo (Figura 2.2).

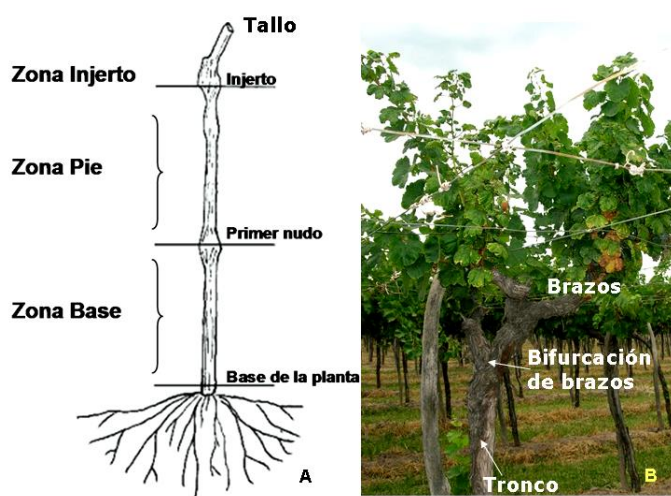


Figura 2.2. Posiciones a lo largo del eje de una vid injertada de ≤ 10 años (A) y de una cepa de > 11 años (B) a partir de las cuales se realizaron los aislamientos de colonias.

En total se muestrearon 103 plantas, a partir de 20 variedades de vid y cuatro portainjertos diferentes. Se obtuvieron 80 colonias correspondientes a aislamientos con características morfológicas del género *Botryosphaeriaceae* de las distintas necrosis identificadas: necrosis blanda (necrosis a); línea negra (necrosis b); zona de color castaño bordeando a la línea negra (necrosis c); necrosis sectorial de color castaño y consistencia dura (necrosis d), puntuaciones negras en las zonas afectadas (necrosis p) y vasos oscurecidos radialmente alrededor del cilindro central. En cuanto a las **variedades** muestreadas, en orden decreciente correspondieron a Malbec (18,4 % respecto del total de variedades), Cabernet Sauvignon (14,5 %), Cereza y Torrontés Riojano (ambos con 11,8 %), Chardonnay y Bonarda (6,6 % respectivamente), Syrah (5,3 %), Pinot Gris (3,9 %), Pedro Gimenez, Riesling, Superior y Merlot (2,6 %, respectivamente), mientras que las variedades Alicante Bouchet, Chenin, Fintendo, Petit Verdot, Sangiovesse, Sauvignon Blanc, Sultanina y Tempranilla con 1,3 %, respectivamente. Las variedades de **portainjerto** mayoritariamente muestreadas fueron 24, de las cuales SO4 representó el 46 % del total (híbrido de *Vitis Berlandieri* x *Vitis Riparia*), 101-14 Mgt el 25 % (híbrido de *V. Riparia* x *V. Rupestris*) y P3309 Couderc el 25 % (híbrido de *V. Riparia* x *V. Rupestris*) y 1103 Paulsen el 4 % (híbrido de *V. Berlandieri* x *V. Rupestris* du lot) (Tablas 2.1 y 2.2).

Tabla 2.1. Número de vides extraídas en las distintas regiones prospectadas (total=103).

| Zona vitícola argentina | Localidad | n° plantas muestreadas |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Mza Centro | Agrelo, Luján de Cuyo | 7 |
| Mza Centro | Ugarteche, Luján de Cuyo | 6 |
| Mza Centro | Mayor Drummond, Luján de Cuyo | 5 |
| Mza Centro | Barrancas, Maipú | 3 |
| Mza Centro | Lunlunta, Maipú | 3 |
| Mza Centro | Medrano, Maipú | 5 |
| Mza Centro | Rusel, Maipú | 4 |
| Mza Norte | Alto Salvador, Lavalle | 5 |
| Mza Este | Rivadavia | 3 |
| Mza Este | San Martín | 3 |
| Mza Este | Santa Rosa | 3 |
| Mza Valle Uco | Vista Flores, Tunuyán | 7 |
| Mza Valle Uco | Tupungato | 3 |
| Mza Sur | Rama Caída, San Rafael | 8 |
| Río Negro | General Roca | 3 |
| San Juan | Albardón | 2 |
| San Juan | El Zonda | 3 |
| San Juan | Pocito | 3 |
| Catamarca | El Puesto | 4 |
| Catamarca | La Puntilla | 3 |
| Catamarca | Santamaría | 3 |
| Catamarca | Tinogasta | 3 |
| Catamarca | Vichigasta | 2 |
| La Rioja | Chilecito | 6 |
| Salta | Cafayate | 3 |
| Salta | El Esteco | 3 |

Tabla 2.2. Procedencia de los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* en estudio.

| Identificación de los aislados | Hospedero | Provincia | Localidad | Edad de la planta (años) | Zona de la planta | Necrosis de procedencia |
|--------------------------------|----------------------|---------------|---------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| B0000 | Chenin | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | tronco | d |
| B0100 | Torrontés riojano | Mza Este | Rivadavia | >30 | tronco | d |
| B0107 | Malbec/SO4 | Mza Valle Uco | Tupungato | 2 | pie | Vasos oscurecidos |
| B0200 | Syrah | Mza Centro | Maipu | >30 | tronco | b |
| B0207 | Cabernet/P.gimenez | Mza Valle Uco | Tupungato | 29 | brazo | Vasos oscurecidos |
| B0301 | Chardonnay/SO4 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 9 | unión injerto | c |
| B0307 | Cabernet | Mza Centro | Luján de Cuyo | 7 | unión injerto | b |
| B0401 | Torrontés riojano | Mza Este | Rivadavia | >30 | tronco | c y d |
| B0407 | Malbec | Mza Centro | Maipu | 5 | tallo | b |
| B0501 | Malbec/101-14 | Mza Centro | Maipu | 2 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B0507 | Torrontés riojano | Mza Centro | Luján de Cuyo | 12 | brazo | d |
| B0601 | Riesling | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | tronco | b |
| B0607 | Fintendo | Mza Valle Uco | Tunuyán | >30 | bifurcación de brazos | d |
| B0701 | Sauvignon blanc | Mza Centro | Luján de Cuyo | 8 | injerto | d |
| B0707 | Malbec/3309 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 6 | injerto | d |
| B0801 | Chardonnay | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | brazo | d |
| B0807 | Bonarda | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | bifurcación de brazos | c y d |
| B0901 | Chardonnay | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | tronco | d |
| B0907 | Petit verdot/3309 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 7 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B1001 | Riesling | Mza Centro | Luján de Cuyo | >30 | brazo | b |
| B1007 | Superior | San Juan | Albardón | 15 | brazo | c |
| B1101 | Malbec | Mza Centro | Maipu | 5 | pie | Vasos oscurecidos |
| B1107 | Malbec/3309 | Mza Valle Uco | Tunuyán | 3 | base | Vasos oscurecidos |
| B1201 | Cabernet | Mza Centro | Maipu | >30 | bifurcación de brazos | d |
| B1207 | Malbec/3309 | Mza Valle Uco | Tunuyán | 3 | base | Vasos oscurecidos |
| B1301 | Cabernet | Mza Centro | Maipu | >30 | brazo | d |
| B1307 | Malbec | Mza Valle Uco | Tunuyán | 6 | tallo | d y b |
| B1402 | Cabernet/ SO4 | Mza Centro | Maipu | 8 | tallo | c |
| B1407 | Chardonnay/SO4 | Mza Este | San Martín | 10 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B1507 | Malbec | Mza Centro | Maipu | 10 | pie | d |
| B1607 | Malbec | Mza Centro | Maipu | 10 | tallo | c |
| B1702 | Malbec | Mza Valle Uco | Tunuyán | >30 | tronco | d |
| B1707 | Chardonnay/SO4 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 5 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B1807 | Malbec | Mza Norte | Lavalle | >30 | brazo | d |
| B1907 | Cabernet/SO4 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 12 | brazo | c |
| B2007 | Bonarda | San Juan | Sarmiento | >30 | brazo | d |
| B2107 | Pedro Gimenez | Mza Sur | San Rafael | >30 | tronco | c |
| B2207 | Torrontés riojano | Salta | Cafayate | >30 | tronco | c |
| B2307 | Cabernet/Chenin | Mza Centro | Maipu | 8 | pie | d |
| B2407 | Malbec/Chenin | Mza Centro | Maipu | 8 | pie | b |
| B2507 | Pedro Gimenez | San Juan | Pocito | 20 | tronco | necrosis d |
| B2607 | Cabernet/SO4 | San Juan | Pocito | 6 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B2707 | Chardonnay/SO4 | San Juan | Pocito | 6 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B2807 | Torrontés riojano | Salta | Cafayate | 12 | brazo | Vasos oscurecidos |
| B2907 | Malbec/1103 | Mza Sur | San Rafael | 7 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B3007 | Cabernet/101-14 | Mza Sur | San Rafael | 7 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B3107 | Syrah/SO4 | Mza Sur | San Rafael | 7 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B3209 | Cereza | Catamarca | Tinogasta | 10 | tallo | Vasos oscurecidos |
| B3309 | Cereza | Catamarca | Tinogasta | 10 | tallo | Vasos oscurecidos |
| B3409 | Pinot/SO4 | Mza Sur | San Rafael | 7 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B3509 | Cabernet | La Rioja | Chilecito | >30 | tronco | d |
| B3609 | Torrontés riojano | La Rioja | Chilecito | >30 | brazo | d |
| B3709 | Merlot/101-14 | Catamarca | Santamaria | 1 | pie | Vasos oscurecidos |
| B3809 | Cabernet/101-14 | Catamarca | Santamaria | 2 | pie | Vasos oscurecidos |
| B3909 | Cereza | Catamarca | El Puesto | 3 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4009 | Torrontés riojano | Catamarca | Vichigasta | 15 | tronco | d |
| B4109 | Cereza | Catamarca | El Puesto | 3 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4209 | Cereza | Catamarca | El Puesto | 3 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4309 | Cereza | Catamarca | La Puntilla | 5 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4409 | Cereza | Catamarca | La Puntilla | 5 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4509 | Cereza | Catamarca | Tinogasta | 5 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4609 | Cereza | Catamarca | El Puesto | 3 | pie | Vasos oscurecidos |
| B4709 | Torrontés riojano | La Rioja | Chilecito | >30 | tronco | Vasos oscurecidos |
| B4809 | Syrah | San Juan | Pocito | >30 | tronco | d |
| B4909 | Merlot | Mza Valle Uco | Tupungato | 3 | pie | Vasos oscurecidos |
| B5009 | Sangiovesse/SO4 | Mza Este | Santa Rosa | >30 | brazo | Vasos oscurecidos |
| B5109 | Bonarda | Mza Norte | Lavalle | 5 | pie | Vasos oscurecidos |
| B5209 | Malbec/Chenin | Mza Centro | Maipu | 12 | brazo | Vasos oscurecidos |
| B5309 | Alicante bouchet/SO4 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 8 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B5409 | Syrah/3309 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 6 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B5509 | Cabernet/101-14 | Mza Centro | Luján de Cuyo | 2 | injerto | Vasos oscurecidos |
| B5609 | Cereza | Mza Valle Uco | Tunuyán | >30 | tronco | d |
| B5709 | Malbec/101-14 | Salta | El Esteco | 7 | unión injerto | b |
| B5809 | Sultanina | Mza Norte | Lavalle | 5 | tallo | b |
| B5909 | Pinot gris/3309 | Mza Valle Uco | Tunuyán | 5 | injerto | c |
| B6011 | Pinot gris/3309 | Mza Valle Uco | Tunuyán | 5 | pie | d |
| B6111 | Bonarda | Mza Sur | San Rafael | >30 | brazo | d |
| B6211 | Superior | San Juan | El Zonda | 15 | brazo | d |
| B6311 | Tempranilla/criolla | Mza Este | San Martín | 28 | tronco | c y p |
| B6411 | Torrontés riojano | Mza Este | Rivadavia | >30 | tronco | c y d |

El aislamiento de *Botryosphaeriaceae* se realizó por el método de Paillasa - Técnica de Norris (1969) modificado, en cámara de flujo laminar. Se extrajeron pequeños trozos de la zona de avance de cada tipo de lesión, se desinfectaron superficialmente por inmersión en hipoclorito de calcio al 1,5 % durante 4 min. Posteriormente, se cultivaron en placas Petri (9 cm) con medio AEM (agar extracto malta) al 1,2 % (Swart *et al.*, 1987), previamente esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min y suplementado con 0,5 g L⁻¹ de cloranfenicol. Se sembraron 3 a 5 placas Petri por muestra y se mantuvieron en estufa a 25 °C, durante 7 días, controlando a diario el desarrollo de colonias fúngicas de especies de interés.

La purificación consistió en repicar una pequeña porción del micelio con características de *Botryosphaeriaceae* desarrollado sobre los trozos, a nuevas placas Petri con medio APG (agar papa glucosado) al 2 % e incubados en estufa a 25 °C en oscuridad. La identificación de la familia se realizó con las claves taxonómicas de Slippers *et al.* (2004) y Phillips *et al.* (2007). Adicionalmente, se contó con cepas de referencia de colecciones particulares cedidos por Dr Phillipe Larignon (Institut Français de la vigne et du vin (ENTAV-ITV France): *Neofusicoccum luteum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *D. mutila*, el teleomorfo de *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum*.

Obtención de cultivos monospóricos

Las estructuras (picnidios) y esporas (conidios) asexuales de los aislamientos en estudio, se indujeron colocando un disco de 6 mm de colonia en activo crecimiento en una placa de Petri con medio AA (agar-agua) 2 %, en la que se depositaron previamente palillos estériles (Smith *et al.*, 1995; van Niekerk *et al.*, 2004). Las cajas se incubaron a 25 °C bajo luz negra continua durante dos semanas (Tovar *et al.*, 2012). Los cultivos monospóricos se obtuvieron a partir de una suspensión conidial en 3 ml de Tween 80 al 0.05 % con agua destilada estéril. Se transfirieron 200 µl de la suspensión a placas Petri con APG 2 % y e incubaron a 25 °C en oscuridad. Entre los cinco y 20 días, las colonias puntuales se transfirieron a una nueva placa Petri y se cultivaron en condiciones óptimas. A fin de evaluar la viabilidad de los conidios producidos por los picnidios en AA, para los aislamientos que esporularon, se colocó un picnidio en 1 ml de agua destilada estéril, se agitó y se depositó con ansa, en condiciones estériles, en placa de Petri con APG al 2 %. Se cultivaron durante 24 h a 48 h a 25 °C y se determinó el % de conidios germinados.

Purificación, conservación de hongos y obtención de inóculos

Se obtuvieron cultivos fúngicos puros a partir de la extracción en condiciones estériles, de discos de agar + micelio obtenidos del margen de la colonia original, con sacabocados (6 mm) y depósito en placas de Petri con medio APG 2 %. Posteriormente, se extrajeron discos de las colonias desarrolladas y se distribuyeron en viales con agua destilada estéril, con APG 2 % inclinado y en placas Petri con APG 2 % mantenidos a 4 °C (Baskarathevan *et al.*, 2009). El inóculo

para los estudios morfológicos y moleculares, consistió en discos de 6 mm de micelio de la zona de crecimiento, obtenido por siembra de discos extraídos de los viales en conservación, en placas Petri con 15 mL de APG 2 % en condiciones estériles e incubación durante 7 días a 25 °C en oscuridad.

Cuantificación de micelio/esporas

Se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC mm⁻³) consistentes en trozos de micelio o conidios) por remoción con espátula, de cada colonia desarrollada en una placa Petri de una semana de crecimiento y se realizó una suspensión en 20 mL de agua destilada estéril. La solución obtenida se llevó a un volumen de 100 ml. Se realizó el conteo de las UFC utilizando un hematócmetro de Neubauer en microscopio con aumento 100x.

Medios de cultivo

Los medios utilizados para cada uno de los ensayos realizados fueron los siguientes: Agar Extracto de Malta (AEM): preparado de Oxoid 15 g, en 1000 ml de H₂O destilada; Agar Papa Glucosado (APG): preparado de Oxoid 39 g, en 1000 ml de H₂O destilada y Agar-Agua (AA): agar bacteriológico Oxoid 12 g, en 1000 ml de H₂O destilada. Se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min. Una vez atemperados se les añadió Cloranfenicol (0,5 g L⁻¹, Merk) para inhibir el crecimiento de bacterias y se extendieron en placas Petri (Anexo 2).

Hipótesis 2: El empleo de caracteres morfológicos y culturales permiten una caracterización útil aunque limitada, de especies fúngicas de la familia *Botryosphaeriaceae* de Argentina.

Objetivo 2: Caracterizar una colección de aislamientos argentinos de *Botryosphaeriaceae*, provenientes de distintas zonas vitícolas argentinas a través de métodos morfológicos clásicos.

2.2.2. Estudio de la variabilidad fenotípica de aislamientos de *Botryosphaeriaceae*

Estudios de tipología y crecimiento de colonias

Se sembraron los inóculos de todos los aislamientos obtenidos (76 colonias), en placas Petri con medio APG al 2 % (5 repeticiones por aislamiento) y se cultivaron a 25 °C en oscuridad. Se observaron las características macroscópicas de las mismas a los 14 días determinando: crecimiento en diámetro (mm) y superficie de colonia (mm²), pigmentación difusible en reverso y adverso de la placa (producción de pigmento: SI o NO), textura (algodonosa, pulverulenta, granulosa o aterciopelada), márgenes (enteros o fimbriados) y formación de estructuras de reproducción (producción de conidios: SI o NO). Se realizaron montajes en portaobjetos, con lactofenol, de fragmentos de agar y micelio de las zonas marginales al punto de siembra del aislado a identificar, para ser observadas en el microscopio.

Un aislamiento proveniente de Rio Negro, dos procedentes de San Juan (identificados como B2607 y B2707) y uno de Mza Valle de Uco (identificado como B0607) fueron excluidos del análisis por no corresponder al género en estudio, según sus características microscópicas observadas.

Estudios de estructuras reproductoras

Se tomaron secciones de cuerpos fructíferos de los aislamientos que esporularon en medio artificial, a partir de colonias de 7 a 20 días de crecimiento, con aguja hipodérmica estéril y se montaron en lactofenol. Se observaron con microscopio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Alemania) con dispositivo de contraste de fases, utilizando aumentos de 100 X y 400 X. Se midieron la longitud (μm) y el ancho (μm) de conidios y se calculó relación longitud/ancho (L/A). Asimismo, se estudió la morfología (según Phillips *et al.*, 2013), presencia de septo (SI o NO), color (marrón o hialino) de conidios mediante fotografías realizadas con cámara HRc AxioCam digital y software asociados (Carl Zeiss Ltd.). Se estudiaron 25 conidios por aislado. Se determinó el porcentaje de conidios germinados a las 24 h de siembra en medio APG, en condiciones estériles e incubación a 25 °C, a través del desarrollo de colonias, por observaciones microscópicas.

El análisis y comparación de los resultados obtenidos, se visualizaron a través de gráficos de Box plots y se utilizó el valor Test como criterio que evalúa estadísticamente las diferencias entre aislamientos en base a las variables registradas, a través de múltiples ANOVAs, la desviación entre la medida sobre el grupo y la medida sobre la población expresada en número de desviaciones tipo de una ley normal (Lebart *et al.* 1995). Cuando valor Test en valor absoluto $\geq 2,58$ (99 % certeza, $p < 0,001$), el caso es altamente significativo***; entre 1,93-2,58 (95 % certeza, $p < 0,01$) el caso es significativamente probable**; entre 1,65-1,94 (90 % certeza, $p < 0,10$) es significativamente poco probable* y $< 1,64$ altamente no significativo (NS).

Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

Se sembraron los inóculos de todos los aislamientos purificados y cepas de referencia, en el centro de placas Petri con 20 ml de medio APG 2 %, con la superficie de micelio en contacto con el medio. Se hicieron crecer en oscuridad, incubándose a las temperaturas 5, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C. Se realizaron 5 repeticiones (placas) de cada aislamiento por temperatura.

Se evaluó el crecimiento radial de la colonia en cada combinación aislado-temperatura cada 24 h hasta que cubrieron la superficie de la placa o hasta que se detuvo su crecimiento (72 h desde inoculación). Se escanearon las placas y se calculó la superficie total (mm^2) mediante programa Carl Zeiss Axiovision 4.7.1 (2008). Las curvas de crecimiento de los aislamientos, obtenidas al graficar la superficie miceliar de las colonias versus el tiempo, se ajustaron con el Programa Excell seleccionando el modelo exponencial para determinar por regresión, los parámetros de crecimiento (velocidad de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo en cada temperatura).

Se calculó la tasa o velocidad de crecimiento, a partir de la pendiente de la función exponencial en mm día^{-1} y la temperatura óptima de crecimiento que corresponde a la temperatura a la cual la tasa es máxima. Con los datos obtenidos de tasa de crecimiento se realizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) con el Programa SPADN y se aplicó el procedimiento de Clasificación Jerárquica directa a través del método de Ward (Césari, 2005).

Pruebas de patogenicidad

Se determinó la patogenicidad de aislamientos “tipo” de cada grupo de aislamientos que se diferenciaron morfológicamente: B0000, B1402, B0701, B1907, B 4407, B0807, B0300, B0307, B2907 y B0107. Se evaluó patogenicidad a través de inoculaciones controladas siguiendo los Postulados de Koch (Agrios, 1996) en 6 plantas *in vitro* cv. *V. rupestris* de 2 meses de edad, en medio de cultivo de micropropagación de vid modificado de Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962), ver Anexo). Las mismas, consistieron en el depósito de inóculo, en condiciones estériles, sobre una incisión en la zona basal de cada tallo, con bisturí estéril. Siguiendo el mismo procedimiento, se inocularon 6 vides con discos de APG sin micelio fúngico, como controles.

Se mantuvieron las plantas a 25 °C, con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, hasta la aparición de síntomas. Entre los 4 y 7 días, se registró la presencia de hojas con clorosis o necrosis (síntomas de la enfermedad en condiciones *in vitro* Gatica *et al.*, 2001). El estado de cada planta se estimó con una escala ordinal (0-3) basada en la determinación visual de síntomas modificada de Zanzotto *et al.*, (2008): 0 = hojas verdes sin síntomas; 1 = hoja con necrosis o manchas rojas; 2 = hojas y tallos castaños y 3 = hojas y tallo completamente necróticos (muerto) con presencia de micelio del hongo. Se aplicaron métodos multivariados de análisis discriminante a través de la Prueba F de Fisher para contrastar las diferencias entre inoculados y controles con el Programa XLSTAT (versión 7,5 2004, Addinsoft).

La efectividad de las inoculaciones fue comprobada mediante el re-aislamiento del hongo, a partir de la zona de inoculación. Se extrajeron 5 trozos de tallo tomados desde la base hacia arriba, para cada planta inoculada y realizaron aislamientos del hongo en medio APG. Posteriormente, se identificaron las colonias por métodos morfológicos.

Hipótesis 3: La utilización de las técnicas moleculares permite el desarrollo de métodos selectivos de detección de patógenos y a través de estudios comparativos entre los datos morfológicos y moleculares, se puede caracterizar e identificar más eficientemente las especies del género fúngico en estudio.

Objetivo 3: Optimizar técnicas de extracción, amplificación, purificación y secuenciación de ADN de *Botryosphaeriaceae*, que permitan la detección rápida y rutinaria de especies de dicho género y asimismo, analizar en conjunto variables morfológicas y moleculares determinando la diversidad de especies presentes en nuestras zonas vitícolas.

2.2.3. Caracterización molecular de aislamientos e identificación de especies

Optimización de la extracción de ADN genómico a partir de micelio *Lasiodiplodia theobromae*

Para optimizar el método de extracción de micelio de *Botryosphaeriaceae* se llevó a cabo el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en medio APG durante 7 días, a 25 °C, en oscuridad. Se recogió la parte aérea de la colonia por arrastre con bisturí estéril (200 mg), se depositó en mortero estéril preenfriado, se congeló y molió con Nitrógeno líquido, se transfirió inmediatamente a tubo Eppendorf de 2 ml y se almacenó a -20 °C.

Se compararon 6 métodos extracción de ADN diferentes según el detergente utilizado (CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o SDS: Dodesilsulfato de sodio) y diferentes reactivos de precipitación del mismo, previamente utilizados por otros autores. Las variables analizadas fueron: concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$) y pureza de ADN (%), concentración de proteínas (mg ml^{-1}), Absorbancia a 260 nm y relación de absorbancia A 260 / 280 (considerándose preparaciones puras valores cuyo cociente fue próximo a 1,8) obtenidos por estimaciones espectrofotométricas y visualización con luz UV. Asimismo, se evaluaron el tiempo de procesamiento (h), manipulación agentes peligrosos (alta, intermedia, baja y sin manipulación) y dificultad de ejecución (alta, media, baja). Se seleccionó y ajustó la técnica más adecuada a fin de ser aplicada para estudiar los patrones obtenidos.

Los métodos utilizados fueron:

- A) Ma *et al.* (2001) modificado** (Bihon *et al.*, 2010; Farr *et al.*, 2005 ; Gure *et al.*, 2005 ; Ma y Michailides, 2002). Consistió en: agregar a la muestra congelada 800 μl de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH=8.0; 700 mM ClNa; 10 mM EDTA Na pH=8; 2 % CTAB (w/v); 1 % betamercaptoetanol (v/v)) bajo campana; homogeneizar e incubar a 68 °C en baño termostatzado; extraer proteínas con igual volumen de cloroformo:isoamilico (24:1) y de isopropanol 100 % y centrifugar 10 y 15 min a 7.000 y 10.000 rpm respectivamente; resuspender el pellet en 100 μl de Buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8); agregar 5 μl de RNAsa ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$); incubar a 37 °C, 30 min; agregar fenol/cloroformo/isoamilico (25:24:1) y centrifugar 5 min a 12.200 rpm; realizar dos extracciones con cloroformo y centrifugar 5 min; recolectar la fase acuosa; agregar 200 μl de etanol absoluto, precipitar a -20 °C durante 30 min y centrifugar 10 min a 13.200 rpm; lavar dos veces con etanol (70 %) y secar a temperatura ambiente; disolver en 100 μl de Buffer TE y conservar a -20 °C.
- B) Gilbertson *et al.* (1991) modificado por Smith y Stanosz (1995)** (Smith *et al.*, 2001; Smith y Stanosz, 2006). Consistió en: agregar 800 μl de buffer SDS (100 mM Tris-HCl pH=8.0; 500 mM ClNa; 50 mM EDTA Na pH=8; 10 mM betamercaptoetanol; 20 % SDS), incubar 10 min a

65 °C, adicionar 160 µl de acetato de Potasio 5 M, pH 5.5 y centrifugar 10 min a 7.000 rpm, agregar 400 µl de isopropanol 100 % a la fase acuosa, incubar 10 min en freezer y centrifugar 10 min a 13.200 rpm, lavar dos veces el precipitado con 400 µl de etanol 70 %, agregar al pellet 100 µl de Buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8) y conservar a -20 °C.

- C) Murray y Thompson (1980) modificado por Rogers *et al.* (1989) and Kim *et al.* (1990)** (Shah *et al.*, 2010; Oliveira-Costa, 2010). Consistió en: agregar al micelio congelado 800 µl de CTAB Buffer (100 mM Tris-HCl pH=8.0; 1,4 M ClNa; 20 mM EDTA Na pH=8; 2 % CTAB (w/v); 0,2 % betamercaptoetanol (v/v); homogeneizar e incubar a 75 °C; agregar igual volumen de cloroformo y centrifugar 10 min a 7.000 rpm; agregar al sobrenadante 500 µl de isopropanol 100 %; incubar durante 15 min a -20 °C y centrifugar 15 min a 7.500 rpm; lavar dos veces 400 µl de etanol 70 %; secar a temperatura ambiente, resuspender en 200 µl de Buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8), agregar Rnasa (0,1 mg ml⁻¹); incubar 2 h a 37 °C; extraer con 2 volúmenes (400 µl) de etanol absoluto y 0,6 vol. (120 µl) de acetato de amonio 5 M; centrifugar 10 min a 12.000 rpm y conservar en 100 µl de Buffer TE a -20 °C.
- D) Lee y Taylor (1990) modificado** (Crous *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Denman *et al.*, 2003). Consistió en disolver y homogeneizar en 800 µl de buffer SDS (50 mM Tris-HCl pH=8.0; 50 mM EDTA Na pH=8; 3 % SDS; 1 % b-mercaptoetanol); incubar una hora a 65 °C; extraer con igual volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y centrifugar 15 min a 9.000 rpm; agregar a la fase acuosa 10 µl de acetato de Na 3 M pH=8 y 0,54 vol. (4,3 µl) de isopropanol 100 %; homogeneizar, mantener 30 min a -20 °C y centrifugar 2 min a 9.000 rpm; lavar una vez con 400 µl de etanol 70 %; secar 1 min a temperatura ambiente, resuspender en 100 µl de Buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8) y conservar a -20 °C.
- E) Kit comercial de extracción Qiagen Dneasy Plant** (Pérez *et al.*, 2009, 2010; Phillips *et al.*, 2002, 2005, 2007, 2008). Consistió en: disolver y homogeneizar con 400 µl de buffer AP1; incubar 2 h a 37 °C con 5 µl de Rnasa (0,1 mg ml⁻¹); agregar 130 µl de buffer AP2, mantener 5 min a -20 °C y centrifugar 5 min a 13.000 rpm; transferir 650 µl de sobrenadante a la columna lila (QIAshredder spin column); centrifugar 3 min a 13.000 rpm; transferir la fracción depositada en el tubo colector a un nuevo microtubo y agregar 0.5 vol. (300 µl) de buffer AP3 y 1 vol. (600 µl) de etanol 100 %; homogeneizar, transferir la fase acuosa a la columna blanca (DNeasy mini spin column) y centrifugar 1 min a 10.000 rpm; transferir la columna a otro vial y centrifugar 1 min a 10.000 rpm, transferir nuevamente, agregar buffer AW (500 µl) y centrifugar 2,5 min a 13.200 rpm; transferir la columna y agregar 100 µl de buffer AE previamente mantenido a 65 °C; incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 10.000 rpm; repetir; resuspender el ADN del tubo colector en buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8) y conservar a -20 °C.

F) Raeder y Broda (1985) modificado por Slippers *et al.* (comunicación personal) (Abdollahzadeh *et al.*, 2009, 2013; Chen *et al.*, 2011; De Wet *et al.*, 2000, 2003, 2008; Gezahgne *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2007; Pavlic *et al.*, 2004, 2008, 2007, 2009; Sakalidis *et al.*, 2011, 2013; Slippers *et al.*, 2004a,b 2005a,b 2005b, 2007a,b). Consistió en: agregar al micelio congelado 800 μ l de buffer SDS (200 mM Tris-HCl pH=8.0; 150 mM ClNa; 25 mM EDTA Na pH=8; 0,5 % SDS); realizar 3 extracciones con igual volumen, una de fenol/cloroformo (5:3) y dos con fenol/cloroformo (1:1) y centrifugar a 13.000 rpm primero 60 min y las otras dos extracciones durante 15 min; agregar 0.1 v/v (70 μ l) de Acetato de K 5 M, pH= 8 y 2 v/v (1.200 μ l) de etanol absoluto; incubar 10 min a -20 °C y centrifugar 30 min a 13.000 rpm; lavar con 400 μ l de etanol 70 %, incubar con 5 μ l de Rnasa (0,1 mg/ml) durante toda la noche a 37 °C; resuspender en buffer TE (0.01 M TrisClH; 0.001 M EDTA Na pH=8) y mantener a -20 °C.

La cuantificación del ADN extraído en cada muestra obtenida por los distintos métodos evaluados, se realizó con el espectrofotómetro “GeneQuant RNA/DNA Calculator” (Pharmacia Biotech) a través de las lecturas de concentración de ADN (μ g ml⁻¹). La estimación de la pureza de cada muestra de ADN obtenido se obtuvo por las lecturas de la relación de DO a 260 nm y 280 nm (DO260/280); la concentración de proteínas (mg ml⁻¹) y la pureza (%). Se cuantificó utilizando una cubeta de cuarzo de 5 mm de longitud de camino óptico y 7 μ l de volumen. El equipo calcula las concentraciones en forma automática a partir de los datos de absorbancia y la relación DO260/280.

Las muestras de ADN ya extraído se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (D1-LE, Byodinamics) al 0,8 % (0,8 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE) a 90 voltios, durante una hora, utilizando TBE (13,5 g Tris Base, 5,5 g de H₃BO₃, 4 ml de 0,5 M de EDTA pH 8) 0,5 M como buffer de corrida. Se sembraron 6 μ l de muestra y 2 μ l de Blue/Orange loading Dye 6X (Promega) (8 μ l en total por cada pocillo). Se compararon las bandas del ADN de las muestras con las obtenidas por los marcadores: Fago λ (Promega) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* + *Hind III* (500 ng) y 100 bp ADN Ladder (Invitrogen). También se sembró un control negativo que contenía todos los componentes de la reacción excepto ADN. Los geles fueron teñidos durante 15 minutos con bromuro de etidio (8 μ g ml⁻¹) en buffer TBE, por agitación suave. Se enjuagó el gel con agua destilada durante 5 min agitando nuevamente y concluida esta etapa se visualizaron las bandas con un transiluminador de luz UV (Gel Doc 100 Gel Documentation System, Bio-Rad) y la documentación de los geles se realizó por fotografía. La imagen fue digitalizada para su posterior análisis con un programa de análisis molecular: Molecular Analysis de BIO-RAD).

Se emplearon métodos multivariados para el análisis de los datos obtenidos: Caracterización de variables nominales (DEMODO) y Caracterización de variables continuas (DESCO). Se discretizaron las variables continuas con el programa XLSTAT-Pro 7.5.3. Los resultados fueron

procesados con SPAD versión 5.5 para Windows. Se caracterizaron los distintos métodos de extracción realizando comparaciones múltiples entre medias y proporciones con las variables evaluadas (continuas y discretizadas) para observar las relaciones significativas estadísticamente.

Se seleccionaron y clasificaron las características más influyentes para cada método de extracción de acuerdo al criterio de Valor-Test decreciente (Hair *et al.*, 1999; Morineau, 1994) y el p-valor asociado a la prueba estadística. Los valores críticos asociados a valores significativos fueron: Valor-Test mayor o igual a 2 en valor absoluto, se consideró la característica significativa para $\alpha = 0,05$; Valor-Test mayor o igual a 2,56 en valor absoluto, $\alpha = 0,01$, y Valor-Test mayor a 3,5, es influyente con un nivel de significación asociado $\alpha = 0,001$. Cuando es mayor o igual a 1 se asocia a un nivel de confianza de 90 %. El signo del Valor-Test indica si la diferencia es en más o en menos respecto el valor de la media general considerada.

Extracción y cuantificación de ADN genómico de micelio de aislamientos argentinos

Las extracciones de ADN de los 74 aislamientos purificados y de los patrones franceses (*L. theobromae*, *D. seriata*, *D. mutila*, *N. luteum*, *N. parvum* y *B. dothidea*) se realizaron a partir de micelio fresco de 7 días, crecido en medio APG al 2 %, empleando el kit de extracción Qiagen Dneasy Plant, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las extracciones exigieron una gran cantidad de materiales estériles, que son ocupados individualmente para cada muestra con el fin de prevenir la contaminación cruzada.

Se determinaron concentración y grado de pureza (de acuerdo a la relación de absorbancia A 260/280) del ADN obtenido con el espectrofotómetro “GeneQuant RNA/DNA Calculator” y por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % empleando el marcador estándar de ADN de λ digerido con *EcoR1* + *Hind III* (Promega) y el marcador 100 bp DNA ladder ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Invitrogen). Finalmente, el ADN se ajustó a una concentración aproximada de 25 ng/ μl con agua Gibco ultrapura (Byodinamics) y posteriormente almacenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Reacciones de amplificación de regiones 5.8S-ITS, β -tubulina y región D1/D2 (NL4) del ADN ribosomal mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con el objeto de identificar los 74 aislamientos argentinos de *Botryosphaeriaceae*, los ADNs extraídos fueron sometidos a reacciones de amplificación de 3 regiones diferentes: 5.8S-ITS, β -tubulina y región D1/D2 (NL4) del ADN ribosomal utilizando cebadores citados en la bibliografía (Tabla 2.3).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Mastercycler gradient 533 I (Eppendorf), en un volumen final de reacción de 50 μl por tubo de reacción. Cada tubo (Eppendorf) contenía Buffer PCR 10X, 50 mM de Cl_2Mg (Promega), 1,5 μM de cada uno de los cebadores correspondientes para ITS, NL4 y β -tubulina y para cada reacción respectivamente, 2 mM de cada uno de los dNTP (ATP, CTP, GTP y TTP, Promega), 5 unidades por μl de Platinun

Taq-DNApolimerasa (Promega), 50 ng de ADN muestra y agua ultrapura miliQ (Gibco) hasta completar el volumen final (Tabla 2.4). La optimización de las condiciones de amplificación se realizó en función de la bibliografía consultada, hasta encontrar una óptima concentración de Cl_2Mg (cofactor de la enzima polimerasa) y de la enzima polimerasa que permitió la obtención de productos bien definidos y repetibles.

Tabla 2.3. Listado de cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR de las regiones ITS completa (ITS1 e ITS2) y el gen 5.8S del ARNr, gen de la β -tubulina y NL4 de especies de la familia *Botryosphaeriaceae*.

| Región amplificada | Cebadores utilizados | Referencias |
|---|------------------------------------|---|
| ITS completa (ITS1 y ITS2) y el gen 5.8S del ARNr | ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') | White <i>et al.</i> , (1990) |
| | ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') | |
| Gen que codifica para la β -tubulina | Bt2a (5'GGTAACCAAATCGTGCTGCTTTC3') | (Glass y Donaldson, 1995, Begoude <i>et al.</i> , 2010) |
| | Bt2b (5'CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC3') | |
| Gen NL4 | ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') | (Alves <i>et al.</i> , 2005) |
| | NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3') | |

Tabla 2.4. Composición de la reacción de amplificación de las regiones ITS completa (ITS1 e ITS2) y el gen 5.8S del ARNr, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores universales **ITS 1** e **ITS 4**.

| Reacción (50 μ L) | Volumen (μ L) | Concentración final |
|--|--------------------|---------------------|
| H ₂ O Gibco ultrapura | 26,0 | --- |
| PCR Buffer 10x | 5,0 | 1x |
| Cl ₂ Mg 50 mM | 1,5 | 1,5 mM |
| dNTP's 2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 5,0 | 0,2 mM |
| Cebador ITS1 1,15 μ M | 5,0 | 0,15 μ M |
| Cebador ITS4 1,15 μ M | 5,0 | 0,15 μ M |
| ADN muestra | 2,0 | 50 ng/ μ L |
| Taq platinum DNA polimerasa 5 (U/ μ L) | 0,5 | 2,5 U/ μ L |

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, “annealing” 45 s a 55 °C y extensión 1 min 30 s a 72 °C, con un ciclo de extensión final de 7 min a 72 °C y mantenimiento a 15 °C. El perfil de temperaturas para la amplificación de una secuencia parcial del gen de la β -tubulina, BT1, fue idéntico al descrito para ITS. Para NL4, las diferencias fueron: tiempo de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos,

“annealing” 30 s a 50 °C, tiempo de extensión de 1 min a 72 °C y extensión final de 10 min a 72 °C. Como control de la reacción para cada par de cebadores utilizados, se emplearon los mismos componentes anteriormente citados excepto que el ADN fue reemplazado por agua.

Se realizó electroforesis de los productos de amplificación, en geles de agarosa al 1,2 % (1,2 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TBE 0,5 X) a 90 voltios durante 1 h. La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$) con agitación durante 15 min. Se cargaron 6 μl de producto de la reacción de amplificación por cada calle, con agregado de 2 μl de Blue/Orange loading Dye 6 X. Se cuantificó por comparación con 6 μl de 100 bp ADN Ladder (Invitrogen, $2,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) en buffer TBE 0,5 X. La visualización y documentación de las bandas se efectuó con un transiluminador de UV.

Restricción enzimática

Cuando los productos de amplificación resultaron monomórficos para las tres regiones del ADN analizadas, se procedió a cortar cada producto amplificado con enzimas de restricción. Para ello se siguió el método propuesto por Alves *et al.*, (2005).

Se realizaron las digestiones de los amplificados correspondientes al gen 5.8S y a las regiones ITS1 e ITS2 y las enzimas utilizadas fueron: *TaqI*, *CfoI*, *AluI*, *HaeIII*, *NciI* de Promega (Slippers *et al.*, 2004a).

Las reacciones de digestión fueron realizadas en un baño termostatzado, en un volumen final de reacción de 25 μl por tubo de reacción. Cada tubo de reacción contenía Buffer 10 X, BSA acetilado (bobine serum albumina), 5 unidades de la enzima de restricción (Promega), producto de amplificación para digerir y agua ultrapura miliQ (Tabla 2.5). Se incubaron las mezclas de digestión durante 3 h a la temperatura sugerida para cada enzima (37 °C excepto para *TaqI* que fue de 65 °C). Se verificaron los productos de digestión mediante electroforesis de 6 μl de producto de digestión enzimática y 2 μL de Blue/Orange loading Dye 6 X, en geles de agarosa al 0,8 % (0,8 g en 100 ml de Buffer TBE 0,5 X), corridas durante 40 min a 90 voltios y luego teñidos con $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio. Se visualizaron y fotodocumentaron en transiluminador UV.

Tabla 2.5. Composición de la reacción de digestión con endonucleasas de restricción.

| Reacción (25 μL) | Volumen (μL) |
|-------------------------------------|---------------------------|
| H ₂ O Gibco ultrapura | 1,63 |
| Buffer 10 x | 2,50 |
| BSA Acetilado | 0,25 |
| Producto de amplificación a digerir | 20,00 |
| Enzima | 0,63 |

En el estudio de caracterización molecular por restricciones enzimáticas de productos amplificados por PCR, se realizó una selección de aislamientos, según el orden cronológico de aislamiento y no se consideraron aislamientos identificados morfológicamente en las restricciones por los costos y tiempo de procesamiento de gran cantidad de muestras. Se incluyeron 29 (del total de 74) aislamientos de *Botryosphaeriaceae* los cuales correspondieron a aislamientos que no esporularon (B2107, B2307, B2407, B2507), aislamientos de *L. theobromae* (B0207, B0607, B0501, B0000, B2207, B2007, B2000, B1702, B1402, patrón), *Diplodia seriata* (B0601, B0701, B0507, B1507, B1607, patrón), *D. mutila* (B1407, B1307, B0707, B0807, patrón), *N. luteum* (B0307, patrón), que fueron identificados en los estudios morfológicos y un patrón de *Neofusicoccum parvum*.

Para cada perfil de restricción (fragmentos obtenidos después de la digestión) visualizado y fotografiado en geles expuestos a luz ultravioleta, se hicieron conteos de las bandas presentes y ausentes con cada enzima, considerando las bandas nítidas, reproducibles y no ambiguas y se le asignó una letra diferente a cada patrón de bandas observado correspondiente a cada aislamiento. Los aislamientos cuyos fragmentos de ADN fueron iguales se asumieron como monomórficos. Posteriormente se registraron en una matriz de datos para su posterior análisis. Para realizar el agrupamiento de los aislamientos, considerando los perfiles de restricción de todas las enzimas, a partir de la matriz de datos generada se analizó por el análisis basado en el método de algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging o Método del promedio aritmético de grupos de pares no ponderados) y Neighbor Joining (Sokal y Michener, 1958), correspondiente al software estadístico NTSYS PC v. 1.7 (Rohlf, 1993). Posteriormente, la construcción del dendrograma se efectuó con la rutina TREE del mismo programa.

Secuenciación e identificación de especies

Los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores ITS1 e ITS4 de 21 aislamientos argentinos de *Botryosphaeriaceae*, fueron purificados empleando el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen, con las instrucciones sugeridas por el proveedor y se almacenaron a -20 °C. La actualización de antecedentes bibliográficos permitió seleccionar la región 5.8S-ITS para realizar el análisis de secuencias, la cual comprende las secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S que codifica para ARNr, siendo la región más ampliamente empleada para los estudios moleculares recientes en *Botryosphaeriaceae* sugiriendo la posibilidad de prescindir de las otras dos regiones del ADN propuestas. Por cada cebador se realizaron dos amplificaciones cada una procedente de extracciones independientes.

Los productos de β -tubulina y NL4 se degradaron, lo que se observó a manera de “chorreado” por debajo de las bandas de interés y, en algunos casos hubo ausencia total de bandas. Se seleccionó la región ITS porque se lograron amplificaciones con productos (bandas) consistentes en ambas repeticiones.

En este último estudio, sólo se seleccionaron fragmentos amplificados de la región 5,8S-ITS purificados de 21 aislamientos de *Botryosphaeriaceae*, representativos de diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas de los aislamientos de referencia de cada especie detectada y aquellos que no esporularon. Posteriormente fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, en el servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, C.N.I.A., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Los aislamientos secuenciados fueron: *L. theobromae* (B6211, B4809, B0207, B3596, B0000), *Diplodia seriata* (B1507, B 3309, B2107 y B4009), *D. mutila* (B4609, B0709, B1307, B4409), *N. luteum* (B0301, B0307, B1807, B3107) y *B. dothidea* (B0407, B1007, B2907, B3007).

Las secuencias directas y reversas de los fragmentos amplificados en la región 5' del ITS 1 y 3' del ITS 4, se revisaron y editaron archivo de texto, excluyendo las regiones ricas en nucleótidos sin resolver (NNNNN) del inicio y final de la secuencia.

Posteriormente, se realizó la búsqueda y reporte de secuencias de especies de *Botryosphaeriaceae* en la base de datos del GenBank (NCBI, National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), se comparó cada secuencia de cada aislamiento estudiado, con la totalidad de las secuencias existentes en la base de datos considerada, se alinearon entre sí y finalmente, se determinó el porcentaje de similitud. Se introdujeron las secuencias una a una y los parámetros especificados fueron: la secuencia problema fue cada una de las 21 secuencias obtenidas, respectivamente; el programa seleccionado para comparar secuencias de nucleótidos fue BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, como base de datos contra la cual realizar la comparación se seleccionó la nr (no redundante) y el formato de resultados se determinó como HTML (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Para establecer la especie con la que cada aislamiento compartía mayor homología, se consideró una identificación definitiva cuando los porcentajes de homología estaban comprendidos entre el 98 % y el 100 %.

Combinando los resultados morfológicos de los aislamientos, con los resultados moleculares y secuenciación de ADN se realizó la identificación de 76 aislamientos argentinos.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Material fúngico

Relevamiento de muestras y obtención de aislamientos fúngicos

Se analizaron 103 plantas de distintas zonas vitícolas argentinas, con sintomatología asociada a enfermedades de madera.

En 59 vides maduras (>11 años de edad) se observaron: hojas pequeñas, cloróticas y con los bordes enrollados hacia abajo, tomando la apariencia de una hoja de malvón; brotes con poco crecimiento y entrenudos cortos; racimos laxos y con granos de tamaño no uniforme (Figura 2.3a). En el tronco, al hacer cortes transversales, predominaron una necrosis amarillenta de consistencia blanda, en posición central o sectorial y otra necrosis dura, castaña en posición sectorial (Figura 2.3b).

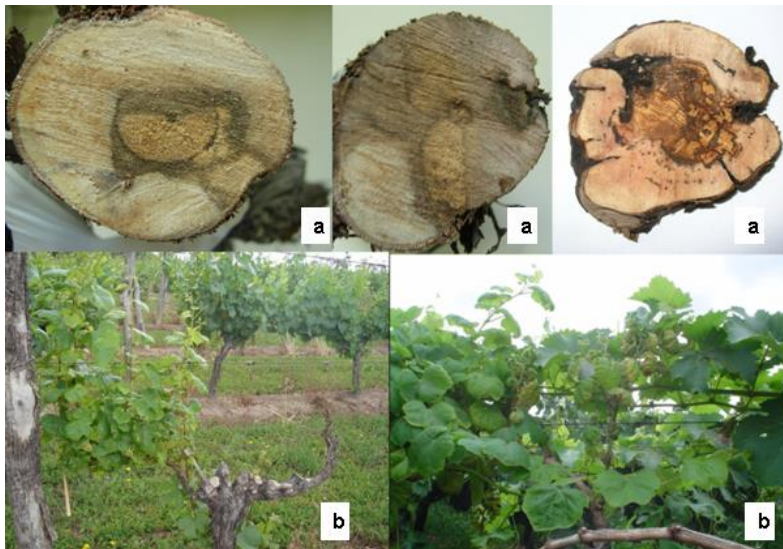


Figura 2.3. Secciones transversales de tronco de vides maduras con Hoja de malvón con síntomas internos (a) y sintomatología característica en follaje (b): deformación de hojas, clorosis, brotes con entrenudos cortos y muerte progresiva iniciando por un brazo.

En 44 vides jóvenes (≤ 10 años) se registraron: decaimiento progresivo, brotes de crecimiento reducido, amarillamiento y falta de brotación (Figura 2.4a). En cortes transversales de pie y tallo, predominaron lesiones en la madera como necrosis sectoriales, oscurecimiento de vasos en la zona del cilindro central y puntos necróticos negros (Figura 2.4c).



Figura 2.4. (a) Secciones transversales de tallos con síntomas internos, obtenidos de vides jóvenes argentinas con decaimiento, (b) oscurecimiento de vasos, necrosis marrón sectorial y estrías marrones longitudinales, (c) crecimiento reducido y clorosis en hojas.

De 103 vides recolectadas, se obtuvieron 80 colonias fúngicas y el 95 % de estos aislamientos resultaron positivos (al menos una colonia de interés). Se eliminaron del análisis cuatro colonias que no correspondían al género en estudio (5 % del total de colonias aisladas) y finalmente se purificaron 76 colonias tipo *Botryosphaeriaceae* con crecimiento rápido en medio APG a partir de las muestras de madera afectada procedentes de cinco oasis de Mendoza (54 colonias, 71 %), Catamarca (11 colonias, 14,5 %), San Juan (5 colonias, 6,5 %), La Rioja (3 colonias, 4 %) y Salta (3 colonias, 4 %).

Los 76 aislamientos se conservaron como discos de micelio en agua estéril en tubos eppendorf y en placas de Petri con APG, mantenidos a 4 °C (Baskarathevan *et al.*, 2009).

Particularmente, en Mendoza, fueron aisladas y purificadas 54 colonias identificadas como *Botryosphaeriaceae*, 29 de estas colonias (53,7 %) procedieron de la Zona Centro (Luján de Cuyo y Maipú); seis (11,1 %) de la zona Este (San Martín y Santa Rosa); seis (11,1 %) de la zona sur (San Rafael); diez (18,5 %) de la zona de Valle de Uco (Tunuyán y Tupungato) y tres (5,6 %) de la zona norte (Lavalle).

Esto sugiere que las especies de este género fúngico están siempre presentes en todas las zonas vitícolas de Mendoza.

A partir de vides jóvenes, se obtuvieron 42 aislamientos detectados en mayor proporción en las zonas del pie (38 %) y de injerto (38 %). Una menor proporción de los mismos se obtuvo del tallo (17 %) y de la zona de unión de injerto (7 %).

Asimismo, del total de colonias aisladas, el 66 % procedieron de muestras con los vasos oscurecidos radialmente alrededor del cilindro central, 12 % de necrosis sectorial d, 9,5 % de la zona b y c, respectivamente y 3 % el resto de diferentes necrosis en conjunto (Figura 2.5).

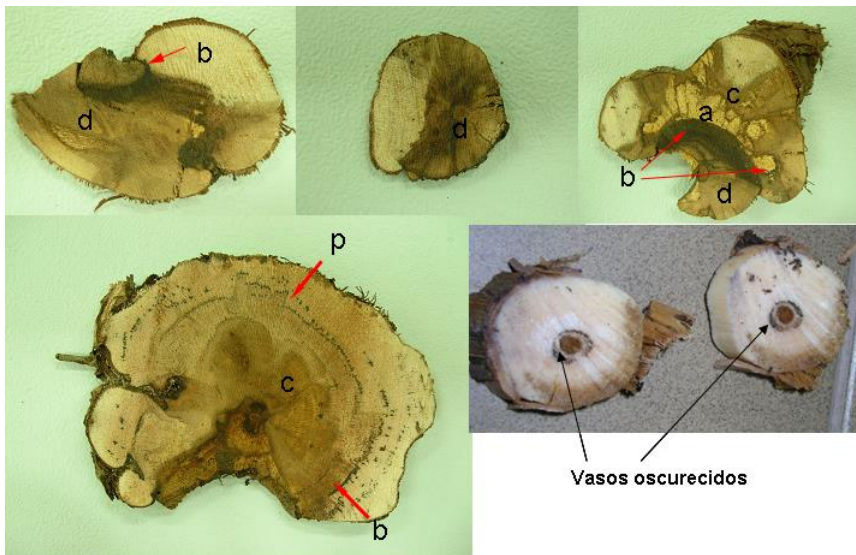


Figura 2.5. Necrosis de madera de vides con decaimiento a partir de las cuales se obtuvieron aislamientos de *Botryosphaeriaceae*. Necrosis blanda color claro (a); línea negra (b); zona de color castaño bordeando a la línea negra (c); necrosis sectorial dura de color castaño (d), puntos necróticos negros (p) y vasos oscurecidos radialmente alrededor del cilindro central.

En plantas maduras (de 38 colonias), predominaron los aislamientos provenientes de troncos (47 %) y de los brazos de la planta enferma (44,2 %) respecto los obtenidos de la zona de bifurcación de brazos (8,8 %). Además, las mayores frecuencias de aislamiento correspondieron a la necrosis sectorial d (53 %) y vasos oscurecidos (14,7 %). El resto se distribuyó en 12 % de la necrosis c, 8,31 % de necrosis b y 12 % del resto de necrosis en conjunto.

2.3.2. Estudio de la variabilidad fenotípica de aislamientos de *Botryosphaeriaceae*

Estudios de tipología y crecimiento de colonias

Los caracteres destacables de la morfología de las colonias se presentan en la Figura 2.6.

A los 14 días de incubación a 25 °C, de un total de 76 aislamientos del género, obtenidos en cultivo puro, 7 (9,2 %) de ellos, presentaron colonias gris blanquecino y abundante micelio aéreo (tipo A). Otros 5 (6,5 %) aislamientos formaron colonias gris oscuro de aspecto granuloso, escasa producción de micelio aéreo y pigmentación difusible amarilla o rojiza en el agar después de 3 días de incubación, tendiendo a desaparecer después de 7 días (tipo B).

Un total de 25 (32,8 %) aislamientos formaron colonias gris oscuro a negro oliváceo, escasa producción de micelio aéreo y aspecto pulverulento (tipo C).

Asimismo, 5 (6,5 %) colonias se distinguieron por color negro y micelio muy chato pegado al medio de cultivo; presentaron color oliváceo al dorso de la placa y márgenes fimbriados (tipo D) y los 34 (45 %) restantes aislamientos formaron colonias gris oscuro que al dorso de la placa se

observan castañas y con micelio aéreo muy abundante y elevado que llega a tocar la tapa de la placa Petri (tipo E).

En un principio, todas las colonias fueron blancas en APG 2 %, tornándose gris verdoso y posteriormente negro desde el segundo al cuarto día de crecimiento.

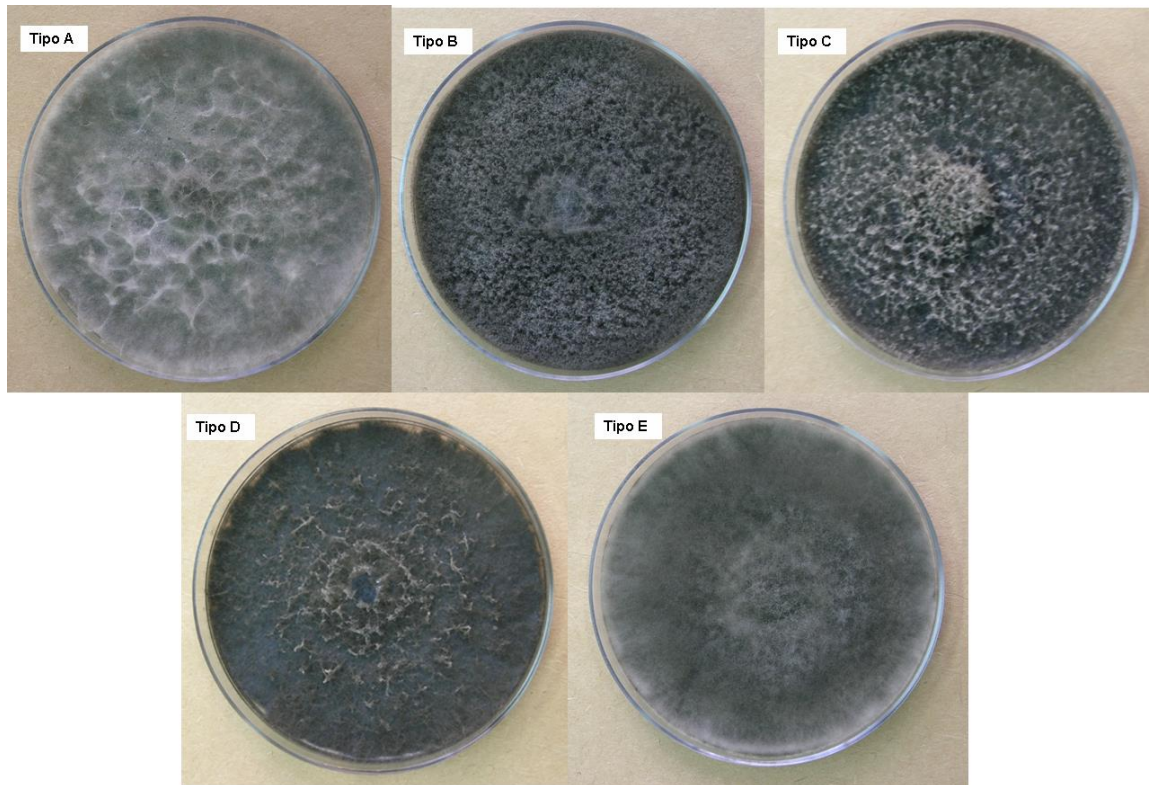


Figura 2.6. Aspecto del anverso de cultivos de *Botryosphaeriaceae* en medio APG a los 7 días de crecimiento, a 25 °C, en oscuridad en los distintos tipos de colonias A, B, C, D y E.

Estudios de estructuras reproductivas. Obtención de cultivos monospóricos.

El 100 % (34 de 34) de los aislamientos del tipo E, el 60 % (15 de 25) de los aislamientos tipo C y el 71 % (5 de 7) de los aislamientos del tipo A produjeron cuerpos fructíferos asexuales (picnidios) entre los 10 y 20 días de crecimiento a 25 °C, con luz negra, en medio AA conteniendo palillos estériles (Figura 2.7).

En el test de germinación, se obtuvo el 100 % de los conidios germinados, a partir de cada picnidio sembrado en medio de cultivo específico, para todos los aislamientos.

Un 23,7 % del total de aislamientos (18 de 76) no esporularon en las condiciones de ensayo (B2107, B2307, B2407, B2507, B3309, B0107, 0407, 1007, B4009, B4209, B5309, B5409, B5509, B2907, B3007, B3107, B4509 y B4609). Incluso dentro de cada “tipo” hubieron colonias que esporularon y otras colonias que no lo hicieron.

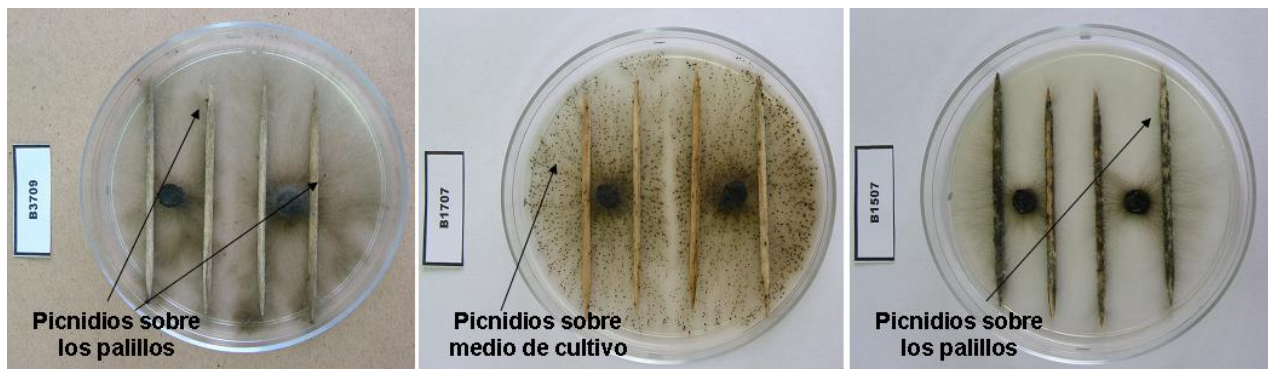


Figura 2.7. Aspecto de micelio y conidios de *Botryosphaeriaceae* después de 30 días de cultivo en medio agar agua con adición de palillos. El aislamiento identificado como B3709 corresponde al grupo tipo A; El aislamiento B1707 representa al grupo tipo E y el aislamiento B1507 representa al grupo tipo C.

En función de los caracteres evaluados (tipo de micelio, producción de pigmento, producción de picnidios, forma y color de los conidios, presencia de septo, longitud en μm , ancho en μm y relación ancho/largo) y la comparación con los aislamientos citados por Phillips, (2006, 2007) y Luque *et al.*, (2005) se pudieron identificar tres especies fúngicas, en clara correspondencia con tres de los cinco tipos de colonias descritos: el Tipo A correspondió al anamorfo *Diplodia mutila* Fr. Ex Mont. de *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, con conidios hialinos y aseptados; el tipo C, correspondió al anamorfo *Diplodia seriata* De Not. de *Botryosphaeria obtusa* (Schwein) Shoemaker con un largo de conidios aseptados coloreados superior los $10\mu\text{m}$ y el tipo E describió al anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) del teleomorfo *B. rhodina* von Arx con conidios hialinos aseptados al inicio que con el tiempo cambiaron a marrón oscuro y con un septado característico.

En los aislamientos del tipo B (B0300, B0307, B1807, B3107, B3209) y D (B0107, B0407, B1007, B2907, B3007), no se desarrollaron estructuras reproductivas, sin embargo el grupo tipo B, fue el único que mostró la pigmentación amarilla a rojiza permitiendo diferenciar así, aislamientos del anamorfo *Neofusicoccum luteum*, del teleomorfo *B. lutea*.

Los aislamientos de *L. theobromae* (Tipo E): B0100, B1201, B607, B1301, B1401, B2007, B3609, B6111, B6211, B0501, B207, B1707, B2807, B3409, B5009, B4909, B6011, B5809, B0000, B1101, B1702, B2207, B3509, B3709, B3809, B3909, B4309, B4709, B4809, B5109, B5609, B6311, B0200, B5709 formaron numerosos picnidios castaños oscuros, en grupo e individualmente sobre la superficie del agar.

Los conidios se presentaron uniseptados, cilindricos con constricción en el septo y extremidades redondeadas y paredes externamente lisas. Sus dimensiones variaron de $19,8\mu\text{m}$ (valor mínimo) a $32,8\mu\text{m}$ (valor máximo) de largo; $10,18\mu\text{m}$ a $23,74\mu\text{m}$ de ancho y relación longitud/ancho entre 1,05 y 2,18 (Tabla 2.6., Figuras 2.8 y 2.9).

Los aislamientos B607 y B4309 fueron eliminados en los estudios posteriores debido a contaminaciones de los cultivos.

Los aislamientos de *D. seriata* (**Tipo C**): B0401, B0601, B701, B801, B901, B1001, B507, B907, B1507, B1607, B1907, B4109, B5209, B5909, B6411 formaron picnidios negros globosos, individuales sobre los palillos.

Los conidios resultaron cilindricos, aseptados, redondeados en los extremos (oblongos) y con notable cicatriz de unión a la célula conidiógena. Color marrón oscuro cuando están maduros y de pared exterior lisa y la interior con ornamentos. Además, mostraron de 16,41 μm -27,40 μm de largo, 5,74 μm -11,36 μm de ancho y relación longitud/ancho entre 1,702 y 4,45 (Tabla 2.6., Figuras 2.8 y 2.9).

De un total de 7 aislamientos de *D. mutila* (**Tipo A**), esporularon B1407, B4409, B0707, B0807, B1307. Formaron escasos picnidios negros, individuales sobre la superficie del agar.

Produjeron conidios hialinos, de paredes lisas, sin septo y al envejecer con un septo tenue y presentaron entre 17,87 μm -23,35 μm de largo, 10,71 μm -15,78 μm de ancho y una relación longitud/ancho media entre 1,28 y 2,47 (Tabla 2.6., Figuras 2.8 y 2.9).

Los resultados obtenidos hasta el momento, a partir de las diferencias significativas obtenidas en las múltiples comparaciones entre aislamientos, corroboran la presencia de tres especies diferentes de *Botryosphaeriaceae* en vides de Argentina en cuanto a las variables: ancho (V Test = 14,31***, P=0.000), longitud (V Test = 5,45***, P=0.000) de conidios y la relación longitud/ancho (V Test = 11,06***, P=0.000).

Los aislamientos de *L. theobromae* (grupo tipo E), presentaron significativamente, valores (μm) de ancho (V Test = 9,8***) y longitud de conidios (V Test = 5,6***) mayores que *D. seriata* y *D. mutila* (grupos C y A) (V Test = -10,42*** y V Test = -4,67***, respectivamente). Por otro lado, los aislamientos de *D. seriata* resultaron con valores significativos de L/A mayores (V Test = 9,28***) que los de *D. mutila* (V Test = -2,25***) y *L. theobromae* (V Test = -8,00***) (Figura 2.9).

Tabla 2.6. Tipo de micelio; producción de pigmento; producción de conidios; forma, color, septación, longitud, ancho y relación L/A de conidios, de aislamientos identificados de *Botryosphaeriaceae* obtenidos de vides con enfermedades de madera en Argentina. El término s/d corresponde a sin descripción debido a que los aislamientos no esporularon en laboratorio.

| Grupo de aislamientos | Micelio | Producción de pigmento | Producción de conidios | Forma de los conidios | Color de los conidios | Presencia de septo | Longitud L (µm) Media ± Desv. típica | Ancho A (µm) Media ± Desv. típica | Relación L/A Media ± Desv. típica | Identificación anamorfo |
|-----------------------|---|------------------------|------------------------|--|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| TIPO A | Gris blanquecino y abundante micelio aéreo | NO | SI | Conidios de extremos redondeados. Paredes lisas, suaves, gruesas y de aspecto vídrico. | Hialinos | aseptados o uniseptados al envejecer | 22,62 ± 3,3 | 12,40 ± 1,4 | 1,87 ± 0,4 | <i>Diplodia mutila</i> (Teleomorfo <i>Botryosphaeria stevensii</i>) |
| TIPO B | Gris oscuro de aspecto granuloso, escasa producción de micelio aéreo | SI | NO | | | | | | | sd |
| TIPO C | Gris oscuro a negro oliváceo, escasa producción de micelio aéreo y aspecto pulverulento | NO | SI | conidios ovato-cilíndricos de paredes lisas en el exterior y rugosa hacia el interior. | Inicialmente hialinos y luego se tornan marrón intenso | aseptados | 22,67 ± 2,1 | 8,60 ± 1,2 | 2,68 ± 0,5 | <i>Diplodia seriata</i> (Teleomorfo <i>Botryosphaeria obtusa</i>) |
| TIPO D | Negro y muy chato pegado al medio de cultivo; presentaron color oliváceo al dorso de la placa y márgenes fimbriados | NO | NO | | | | | | | sd |
| TIPO E | Gris oscuro que al dorso de la placa se observan castañas y con micelio aéreo muy abundante y elevado | NO | SI | Conidios de extremidades redondeadas, presencia de constricción en el septo y paredes externamente lisas | Coloreados desde los estadios iniciales, marrón intenso | uniseptados | 25,35 ± 2,8 | 14,2 ± 1,7 | 1,79 ± 0,2 | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Teleomorfo <i>Botryosphaeria theobromae</i> = <i>Botryosphaeria rhodina</i>) |

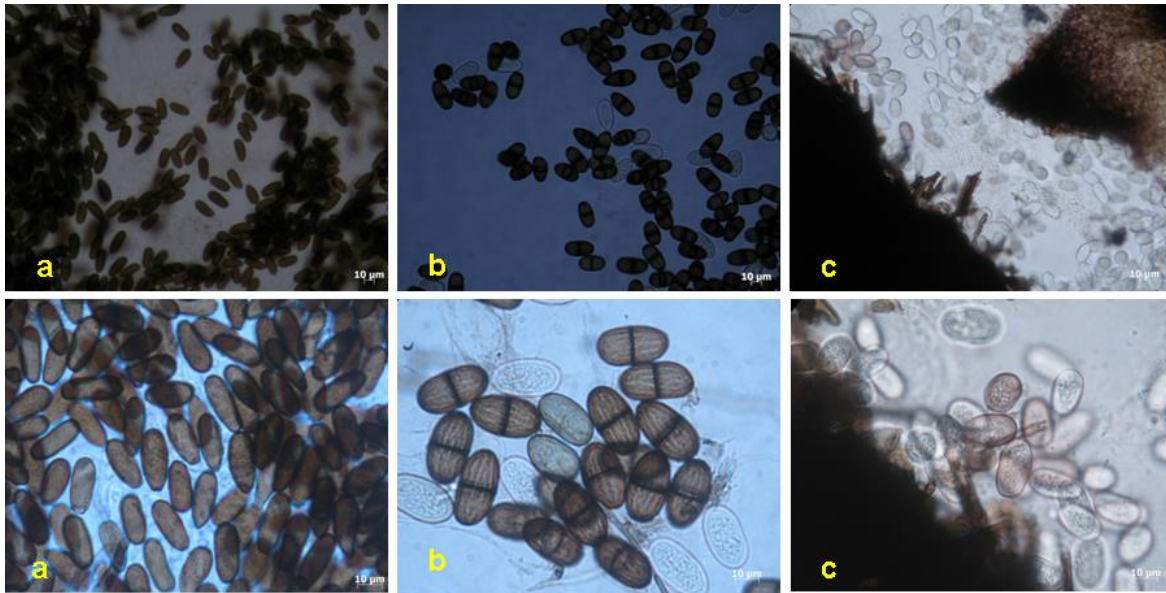


Figura 2.8. Conidios de distintas especies de *Botryosphaeriaceae* encontrados en vid, incubadas 20 días, a 25 °C en oscuridad y APG 2 %. a) *Diplodia seriata*, b) *Lasiodiplodia theobromae*, c) *Diplodia mutila* (fotos superiores observadas con microscopio con aumento 40X y fotos inferiores con aumento 100X).

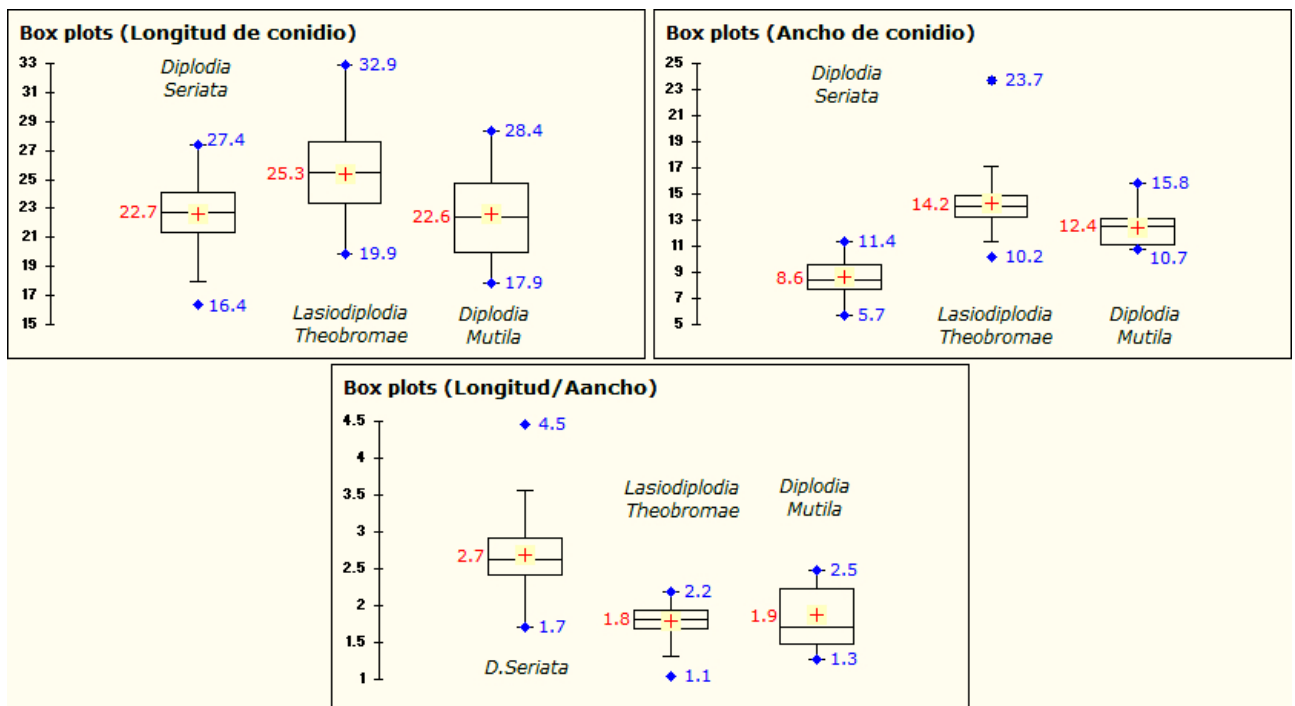


Figura 2.9. Diagramas Box plots¹ ilustran la distribución de longitud (L) en μm , ancho (A) en μm y relación L/A de aislamientos que esporularon, de *Botryosphaeriaceae* de vides con enfermedades de madera en Argentina (n=4, con cuatro plantas por repetición) medidos a los 21 días post-inoculación.

¹ La línea sólida y el signo + dentro de la caja corresponden a la mediana y media, respectivamente. Las barras tope de cada caja corresponden a 25 percentil (inferior) y 75 percentil (superior) de los datos. Las barras externas representan los percentiles 10 y 90 y los puntos representan los valores mínimo y máximo (percentiles 5 y 95).

Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

El estudio del ritmo de crecimiento del patógeno en las condiciones *in vitro*, de una idea del comportamiento del mismo, en la planta. En la tabla 2.7 se muestran las relaciones significativas entre la superficie de las colonias desarrolladas (mm²) de los 76 aislamientos y el tiempo de crecimiento (h) en APG, en oscuridad, para cada temperatura de estudio.

Tabla 2.7. Valores significativos de superficie de la colonia promedio (mm²), en APG y oscuridad, de 76 *Botryosphaeriaceae* spp. mantenidos a diferentes temperaturas en un rango de 5 a 40 °C en función del tiempo (Valor Test² se utilizó como valor crítico de prueba asimismo, se describe el p-value asociado).

| Tiempo | Superficie promedio de colonia (mm ²) Media ± desvío típico | Valor-Test | P value |
|--------------|---|------------|---------|
| 5 °C | | | |
| Inicial | 50 ± 0 | 6,54 | 0,0000 |
| 24 h | 50 ± 0 | -7,00 | 0,0000 |
| 48 h | 50 ± 0 | -7,48 | 0,0000 |
| 72 h | 50 ± 0 | -8,97 | 0,0000 |
| 10 °C | | | |
| Inicial | 50 ± 0 | 6,36 | 0,0000 |
| 24 h | 50 ± 0 | -6,81 | 0,0000 |
| 48 h | 57,68 ± 28 | -7,15 | 0,0000 |
| 72 h | 68,58 ± 23 | -8,55 | 0,0000 |
| 15 °C | | | |
| 48 h | 100,68 ± 22 | -6,45 | 0,0000 |
| 24 h | 52,19 ± 8 | -6,59 | 0,0000 |
| Inicial | 45,00 ± 6 | 7,03 | 0,0000 |
| 72 h | 228,88 ± 52 | -7,06 | 0,0000 |
| 20 °C | | | |
| Inicial | 46,00 ± 11 | -4,36 | 0,0000 |
| 72 h | 2652,61 ± 13 | 15,52 | 0,0000 |
| 48 h | 1100,51 ± 23 | 9,85 | 0,0000 |
| 25 °C | | | |
| Inicial | 50 ± 0 | 6,36 | 0,0000 |
| 24 h | 181,551 ± 12 | 6,35 | 0,0000 |
| 30 °C | | | |
| 48 h | 1504,39 ± 24 | 16,43 | 0,0000 |
| 72 h | 2731,87 ± 16 | 16,26 | 0,0000 |
| 24 h | 262,00 ± 9 | 14,40 | 0,0000 |
| Inicial | 50 ± 0 | 6,36 | 0,0000 |
| 35 °C | | | |
| 24 h | 187,49 ± 11 | 6,77 | 0,0000 |
| 48 h | 675,07 ± 26 | 2,84 | 0,0023 |
| A inicial | 45,81 ± 9 | -4,74 | 0,0000 |
| 40 °C | | | |
| 48 h | 45,32 ± 8 | -7,35 | 0,0000 |
| 24 h | 44,00 ± 10 | -7,41 | 0,0000 |
| 72 h | 47,34 ± 8 | -8,75 | 0,0000 |
| Inicial | 44,00 ± 10 | -9,71 | 0,0000 |

² Valor Test es el valor crítico de prueba que evalúa estadísticamente, la desviación entre la medida sobre el grupo y la medida sobre la población expresada en número de desviaciones tipo de una ley normal (Lebart et al. 1995) para describir los resultados significativos. El signo del V test determina la relación de la variable con la clase en sus valores altos (+) o valores (-). Se consideró que, para valor valor Test en valor absoluto $\geq 2,58$ (99% certeza, $p < 0,001$), el caso es altamente significativo***; entre 1,93-2,58 (95% certeza, $p < 0,01$) el caso es significativamente probable**; entre 1,65-1,94 (90% certeza, $p < 0,10$) es significativamente poco probable* y $< 1,64$ altamente no significativo (NS).

Todos los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* crecieron entre 25 °C y 35 °C, mientras que algunos de ellos no se desarrollaron a 15 °C y 35 °C. Asimismo, ningún aislamiento evaluado manifestó crecimiento a 5 °C y sólo uno de ellos mostró crecimiento reducido a 40 °C. Por otro lado, los resultados muestran que a 10 °C y 15 °C, los hongos presentaron menores valores de superficie. Además, entre las temperaturas de 10 °C y 30 °C, los aislamientos presentaron los mayores valores de superficie de la colonia a las 72 h de crecimiento. A una temperatura alta, de 35° C, el micelio fúngico, cuando se desarrolló, alcanzó mayor superficie a las 48 h.

Los valores de Test críticos asociados a pruebas múltiples de análisis de varianza mostraron diferencias significativas entre los aislamientos de *Botryosphaeriaceae*, en cuanto a la superficie del micelio (mm²) a las 72 h de crecimiento en APG a 15 °C (V Test =6,8, P<0.0000); 20 °C (V Test =6,7, P<0.0000); 25 °C (V Test =8,95, P<0.0000); 30 °C (V Test =5,76, P<0.0000); 35 °C (V Test =3,2, P<0.0001).

Los valores de superficie en función de la temperatura para los distintos aislamientos se ajustaron matemáticamente a una curva de regresión, cuya expresión general fue: $Y = a \cdot e^{b \cdot x}$, logrando el mejor ajuste para todos los aislamientos. El valor Y representó la superficie de crecimiento (mm²), el valor x correspondió a la temperatura de crecimiento y los valores de *a* y *b* representaron coeficientes de regresión. A partir de la derivación de las ecuaciones obtenidas, se obtuvo para cada aislamiento tipo, la fórmula: $\ln y = \beta \cdot x + \ln \cdot a$

Se obtuvieron tantas fórmulas como combinaciones de aislamientos y temperaturas considerados y las mismas, permitieron estimar las tasas de crecimiento diario (mm² día⁻¹) a través del valor de la pendiente obtenido, según la fórmula $T = \beta$ (pendiente de la función $\ln y$) / (promedio de las tasas en el tiempo). Se calcularon las tasas de crecimiento de 32 colonias tipo *L. theobromae* (se eliminaron del análisis dos aislamientos por contaminaciones: B0607 y B4309), 15 colonias del tipo *D. seriata* y cinco colonias de *D. mutila* que esporularon en medio de cultivo respectivamente. Asimismo, se calcularon las tasas de crecimiento de cuatro colonias de *N. luteum*, ya que si bien no esporularon, pudieron identificarse por su coloración del medio.

También se estudiaron 15 aislamientos que no esporularon artificialmente y no pudieron ser identificados fehacientemente y se calcularon las tasas de crecimiento a fin de compararlas con las de los ya identificados. Igualmente se procedió a calcular las tasas de crecimiento de los patrones identificados, para ser consideradas en el primer análisis de componentes principales: *L. theobromae* (1 colonia), *D. mutila* (1 colonia), *D. seriata* (1 colonia), *N. luteum* (2 colonias) y *Botryosphaeria dothidea* (1 colonia).

Se seleccionaron los dos factores que presentaron los valores propios más altos en el análisis ACP de tasa de crecimiento diaria a diferentes temperaturas de incubación. Ambos ejes explicaron el 87,33 % de la variabilidad total, con un 53,47 % y 33,86 %, respectivamente. Los resultados significativos se mostraron en el plano factorial de los dos factores seleccionados, confeccionado a

partir de las coordenadas de individuos para cada repetición de cada tratamiento y de las coordenadas de las variables sobre ambos ejes factoriales (Figura 2.10). La dirección de los vectores que correspondieron a cada temperatura, indicaron los mayores valores de tasa de crecimiento diaria y la proyección en dirección opuesta señaló los valores más bajos. Asimismo, se representó cada grupo tipo con un color característico y aquellos aislamientos que no fueron caracterizados morfológicamente (porque no esporularon), se representaron con color gris. En el gráfico, todos los puntos de colores tienen una designación, aunque en algunos casos de *L. theobromae* y *D. seriata* están próximos que no fue posible editarlo. Los aislamientos argentinos se asociaron entre sí y con los patrones identificados, por la proximidad en el espacio y pudieron ser agrupados en 6 cluster, siendo identificada la distribución de los grupos por colores. La selección de las clases óptimas se realizó según la menor relación inercia-intra (dentro del cluster) y la mayor inercia-inter (entre cluster) y se optimizó la partición mediante el algoritmo K-mean.

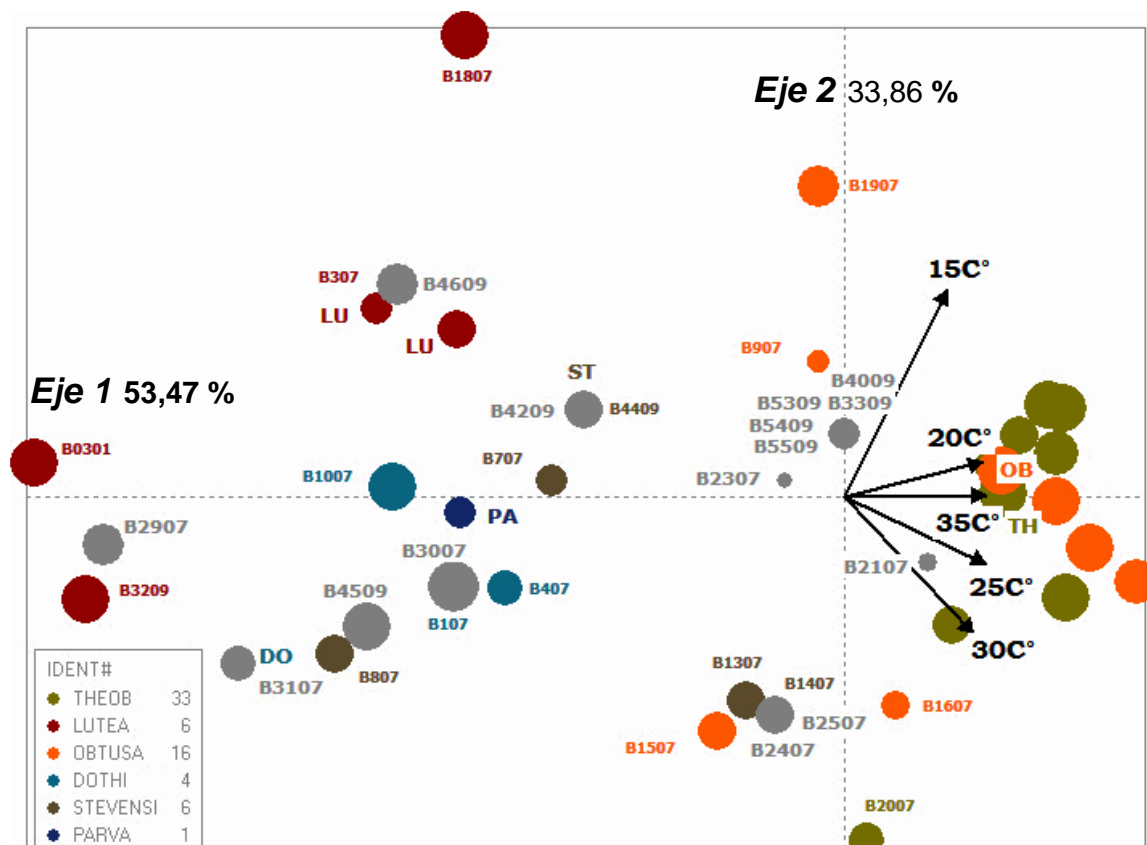


Figura 2.10. Proyección de patrones y aislamientos argentinos de *Botryosphaeriaceae* que se identificaron por sus características morfológicas, sobre el primer plano factorial seleccionado del ACP en función de la tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Las nomenclaturas: LU, ST, PA, DO, OB y TH correspondieron a los patrones de *Neofusicoccum luteum*, *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*. Todos los puntos de colores tienen una designación aunque no estén editados en el gráfico.

Se obtuvo una clasificación de los aislamientos no identificados por ausencia de esporulación, al proyectar los mismos ilustrativamente sobre el plano factorial del ACP obtenido y

realizar una clasificación jerárquica de Ward que resultó en una identificación de los individuos en distintas clases con validaciones superiores al 95 % de certeza (Valores Test entre 1,93-2,58). En éste último análisis, se eliminaron dos aislamientos de *D. seriata* contaminados (B1907, B5209). La distribución de los grupos en el plano factorial explicó un 80,73% de variación: 65,88 % y 14,85%, para los ejes 1 y 2, respectivamente (Figura 2.11).

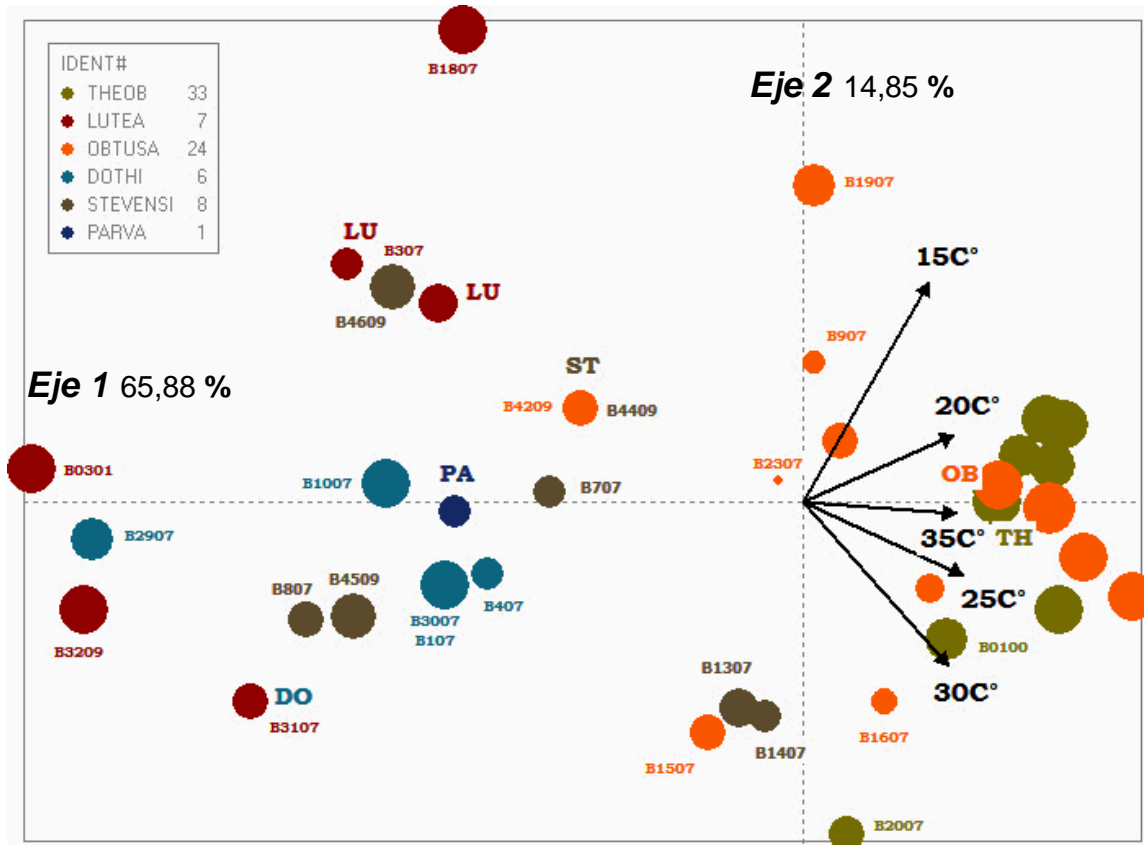


Figura 2.11. Proyección del total de aislamientos de *Botryosphaeriaceae* estudiados, sobre el primer plano factorial del ACP en función de la tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Las nomenclaturas: LU, ST, PA, DO, OB y TH correspondieron a los patrones de *Neofusicoccum luteum*, *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*. Todos los puntos de colores tienen una designación aunque no estén editados en el gráfico.

La Tabla 2.8 describe las Tasas de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$) de *Botryosphaeriaceae* spp. a distintas temperaturas en APG y oscuridad y asimismo, permite interpretar el gráfico resultante del ACP (Figura 2.11). Los aislamientos de *L. theobromae* (círculos verdes) mostraron tasas de crecimiento altas a las temperaturas de 15 $^{\circ}\text{C}$ a 35 $^{\circ}\text{C}$ con valores significativos mayores a la media general. Aislamientos de *D. seriata* (círculos naranjas) tuvieron crecimiento de 10 $^{\circ}\text{C}$ a 30 $^{\circ}\text{C}$ con tasas mayores a la media general. Contrariamente, en los casos de *D. mutila* (círculos marrones) y *N. luteum* (círculos rojos), presentaron significativamente tasas de crecimiento por debajo de la media, en el rango de 15 $^{\circ}\text{C}$ a los 35 $^{\circ}\text{C}$ (se observa en la dirección contraria de los vectores de temperatura). *B. dothidea* (círculos celestes), se caracterizó crecimiento a 40 $^{\circ}\text{C}$ (tasas superiores a

la media) y tasas menores a las otras temperaturas (desde 15 °C a 35 °C). Este vector de temperatura, no se incluyó en la ilustración porque está explicado en el tercer eje del ACP.

Tabla 2.8. Tasa de crecimiento (mm² día⁻¹) de los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* a distintas temperaturas en APG y oscuridad (Valor Test³ se utilizó como valor crítico de prueba, asimismo, se describe el p-value asociado).

| Especie identificada | Temperatura | Tasa de crecimiento (mm ² día ⁻¹) | | valor Test | p-value asociado |
|---|-------------|--|---------------|------------|------------------|
| | | X ± σ grupo | X ± σ General | | |
| <i>L. theobromae</i> (33) B0100, B1201, B1301, B1401, B3609, B6111, B6211, B0501, B0207, B1707, B2807, B3409, B5009, B4909, B6011, B5809, B0000, B1101, B1707, B2207, B5709, B0200, B3509, B3709, B3809, B3909, B | 35 °C | 5,15±0,96 | 3,83±1,80 | 5,29 | 0,0000 |
| | 25 °C | 5,84±0,19 | 5,59±0,40 | 4,11 | 0,0000 |
| | 20 °C | 5,26±0,29 | 4,72±1,03 | 3,87 | 0,0001 |
| | 30 °C | 5,61±0,16 | 5,33±0,56 | 3,60 | 0,0002 |
| | 15 °C | 3,54±0,98 | 3,17±1,2 | 2,28 | 0,0114 |
| <i>D. seriata</i> (24) B0401, B0601, B0701, B0801, B0901, B1001, B0507, B0907, B1507, B1607, B4109, B5909, B6411, B2107, B2307, B2407, B2507, B3309, B4009, B4209, B5309, B5409, B5509, patrón | 15 °C | 3,68±0,66 | 3,17±1,20 | 2,45 | 0,0071 |
| | 30 °C | 5,54±0,32 | 5,33±0,56 | 2,17 | 0,0148 |
| | 25 °C | 5,76±0,23 | 4,59±0,46 | 2,11 | 0,0175 |
| | 20 °C | 5,05±0,37 | 4,72±1,03 | 1,85 | 0,0324 |
| | 10 °C | 0,29±0,98 | 0,12±0,63 | 1,60 | 0,0050 |
| <i>D. mutila</i> (8) B1407, B4409, B4609, B0707, B0807, B1307, B4509, patrón | 25 °C | 5,23±0,44 | 5,59±0,46 | -2,34 | 0,0096 |
| | 15 °C | 2,16±1,21 | 3,17±1,2 | -2,49 | 0,0063 |
| | 35 °C | 1,74±1,20 | 3,83±1,86 | -3,32 | 0,0004 |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> (6) B0107, B0407, B1007, B2907, B3007, patrón | 40 °C | 0,38±0,66 | 0,05±0,27 | 3,00 | 0,0014 |
| | 35 °C | 1,99±0,96 | 3,83±1,86 | -2,49 | 0,0064 |
| | 30 °C | 4,76±0,34 | 5,33±0,56 | -2,55 | 0,0054 |
| | 25 °C | 4,97±0,41 | 5,59±0,46 | -3,39 | 0,0003 |
| | 15 °C | 1,35±0,74 | 3,17±1,2 | -3,82 | 0,0001 |
| <i>Neofusicoccum luteum</i> (7) B0301, B0307, B1807, B3209, B3109, patrones (2) | 20 °C | 3,15±1,29 | 4,72±1,03 | -3,84 | 0,0001 |
| | 35 °C | 1,23±0,96 | 3,83±1,86 | -3,83 | 0,0001 |
| | 25 °C | 4,92±0,41 | 5,59±0,46 | -3,99 | 0,0000 |
| | 20 °C | 3,03±0,63 | 4,72±1,03 | -4,50 | 0,0000 |
| | 30 °C | 4,14±0,54 | 5,33±0,56 | -5,81 | 0,0000 |

La temperatura óptima de todos los aislamientos pertenecientes a cada grupo tipo resultó ser significativamente, de 25 °C, dónde se alcanzó la mayor tasa de crecimiento para cada uno.

³ Valor Test es el valor crítico de prueba que evalúa estadísticamente, la desviación entre la medida sobre el grupo y la medida sobre la población expresada en número de desviaciones tipo de una ley normal (Lebart et al. 1995) para describir los resultados significativos. El signo del V test determina la relación de la variable con la clase en sus valores altos (+) o valores (-). Se consideró que, para valor valor Test en valor absoluto ≥ 2,58 (99% certeza, p<0,001), el caso es altamente significativo***; entre 1,93-2,58 (95%certeza, p<0,01) el caso es significativamente probable**; entre 1,65-1,94 (90% certeza, p<0,10) es significativamente poco probable* y <1,64 altamente no significativo (NS).

Los aislamientos de *D. seriata* mostraron crecimiento micelial a 10 °C (representaron el 73 % del total de aislamientos que crecieron a esa temperatura). *Neofusicoccum luteum* representó el 27 % restante de aislamientos que crecieron a 10 °C pero no fue significativo estadísticamente (Tabla 2.8).

B. dothidea, se desarrolló a 40 °C de temperatura y correspondió al 53 % del total de hongos que crecieron a esa temperatura, mientras que el resto, *D. seriata* (37 %) y *N. luteum* (10 %) no resultaron significativos estadísticamente. A las temperaturas de 15 °C y 20 °C, los aislamientos de *Lasiodiplodia theobromae* y *D. seriata* presentaron las mayores tasas de crecimiento diario. Los aislamientos de *L. theobromae*, *D. seriata* y *Diplodia mutila* incubados a 25 °C, 30 °C y 35 °C, presentaron mayores tasas de crecimiento diario que *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum* y *B. dothidea* (Tabla 2.8).

Pruebas de patogenicidad por cumplimiento de postulados de Koch.

Todos los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* representantes de los grupos tipo identificados: B0000, B1402 (*L. theobromae*, grupo E); B0701, B1907 (*D. seriata*, grupo C); B4407, B0807 (*D. mutila*, grupo A); B0300, B0307 (*N. luteum*, grupo B) y B2907 y B0107 (Grupo D), resultaron patógenos al cultivar *V. rupestris* cumpliendo con los Postulados de Koch.

Los resultados del recuento de ufc (unidades formadoras de colonias) establecieron que el potencial de inóculo utilizado varió entre $2,5 \times 10^6$ y $3,8 \times 10^6$ ufc ml⁻¹. El avance de la enfermedad medido a través de la determinación visual de síntomas, mostró diferencias significativas entre inoculados y testigos con nivel de confianza del 99 % (P=0.000).

Se observaron síntomas (grado 2 y 3 según Zanzotto *et al.*, 2008) en el 100 % de las plantas de *V. rupestris*, a los 4 días desde la inoculación. Las plantas mostraron reducción de crecimiento, oscurecimiento de tallos, clorosis y enrojecimiento de bordes en hojas (algunas enruladas hacia abajo) y muerte de plantas. En ese lapso, el 100 % de las plantas inoculadas fueron alcanzadas por el desarrollo del micelio de los hongos.

Asimismo, las plantas, se diferenciaron significativamente de los testigos, los que presentaron la escala 0 = hojas verdes sin síntomas (Zanzotto *et al.*, 2008) y crecieron normalmente (Figura 2-12).

La efectividad de las inoculaciones, siguiendo los postulados de Koch, fue comprobada mediante el re-aislamiento de los hongos, a partir de la zona de inoculación, en un 100 % de las plantas, en cada una de las cinco repeticiones, para los diez aislamientos estudiados (representantes de cada grupo morfológico observado).



Figura 2.12. Sintomatología observada en las pruebas de patogenicidad. Tres plantas *in vitro* de *V. rupestris* con síntomas grado 3 según Zanzotto *et al.*, (2008), a los cuatro días de la inoculación con *L. theobromae* (A) y tres testigos sanos (B).

Una vez caracterizados morfológicamente los aislamientos, se analizó el origen de los mismos. Del total de aislamientos de la **necrosis b**, los correspondientes a *L. theobromae* y *D. seriata* correspondieron a un 37,5 % respectivamente, mientras que *N. luteum* y *B. dothidea* se presentaron en un 12,5 %, respectivamente. En la **necrosis sectorial d**, el 59 % de aislamientos correspondieron a *L. theobromae*, el 33 % a *D. seriata* y el restante 8 % a *N. luteum* y *D. mutila*. En la **necrosis c** se obtuvieron *D. seriata* (50 %), *L. theobromae* (25 %), *N. luteum* (12,5 %) y *B. dothidea* (12,5 %). Asimismo, se obtuvieron a partir de los vasos oscurecidos: *L. theobromae* (45 %), *D. seriata* (26 %), *D. mutila* (12,5 %), *B. dothidea* (10 %) y *N. luteum* (6,5 %).

A partir de **plantas de < 10 años** se aislaron *L. theobromae* (34,15 %), *D. seriata* (31,71 %), *D. mutila* (14,63 %), *N. luteum* (9,76 %) y *D. mutila* (9,76 %). En **plantas de > 10 años**: *L. theobromae* (57,14 %), *D. seriata* (32,89 %) mientras que *D. mutila* se aisló en 9,21 % y los grupos restantes correspondieron a un 6,58 %, respectivamente.

Por otro lado, se aisló *D. mutila* del tronco (42,86 %) y zona de bifurcación de brazos (14,29 %) en vides maduras y de la zona de injerto (28,57 %), e igual % de la zona de tallo de vides jóvenes. Los aislamientos de *N. luteum* se obtuvieron de brazos de vides maduras (40 %) y de unión injerto (20 %) e injerto (40 %) de vides jóvenes. *D. seriata* fue aislada de tronco (48 %) y brazos de plantas maduras (20 %) y de injerto (32 %) en vides jóvenes. Particularmente para *B. dothidea* el 40 % de aislamientos respecto del total del grupo se obtuvieron de la zona de injerto de vides jóvenes, y con 20 % se aislaron de brazos, tallos y tronco de las cepas. *L. theobromae* se aislaron de todas las zonas evaluadas: en un 41,18 %, 5,88 %, 17,65 % de troncos, bifurcación de brazos y brazos, respectivamente. En vides jóvenes se aislaron 2,94 % de la base y tallo respectivamente, 5,88 % de la unión de injerto y pie respectivamente y el 17,65 % de injerto.

2.3.3. Caracterización molecular de aislamientos e identificación de especies

Optimización de la extracción de ADN genómico a partir de micelio *L. theobromae*. Calidad y cuantificación de ADN.

Los resultados obtenidos en el análisis del tiempo de procesamiento, manipulación de sustancias peligrosas y dificultad de los métodos empleados, reflejó que los protocolos **C**, **A** y **F** demandaron un período más extenso (entre 5 horas y 6 horas y media), considerando la media de tiempo general. En el caso de las **técnicas B** y **D** el tiempo empleado se consideró medio empleando entre 3,5 y 5 horas. El **método F** requirió un tiempo bajo de proceso de sólo 3 horas (Tabla 2.9).

Los métodos **A**, **F**, y **D** se caracterizaron por una alta manipulación de agentes peligrosos (Nitrógeno líquido, 2-mercaptoetanol, cloroformo, Fenol, SDS, fenol/cloroformo/isoamilico, cloroformo/isoamilico), lo que implicó una dificultad de proceso alta. El **método D** se asoció a una alta manipulación de agentes peligrosos y media dificultad de ejecución y el **método B** presentó manipulación intermedia de agentes (Nitrógeno líquido, B-mercaptoetanol y SDS) y baja dificultad de proceso. El método más simple y sin manipulación de agentes fue el **método E** (Tabla 2.9).

Los resultados de absorbancia; relación A260/A280; concentración de ADN, proteínas y pureza revelaron diferencias significativas entre los métodos (F de Fischer:1111; P=0.000).

A través del **método A** se extrajeron concentraciones medias a altas de ADN ($103,75 \mu\text{g ml}^{-1}$ – $255 \mu\text{g ml}^{-1}$), mientras que el **método F** se caracterizó significativamente por las mayores concentraciones ($255 \mu\text{g ml}^{-1}$ – $315,9 \mu\text{g ml}^{-1}$) respecto los otros métodos (media general = $94,18 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los **métodos B** y **D** se asociaron a muy bajas concentraciones de ADN (0 – $45 \mu\text{g ml}^{-1}$), con una media de $16,10$ y $18,50 \mu\text{g ml}^{-1}$ comparados con la media general, respectivamente. El **método C** presentó una media de $33,87 \mu\text{g ml}^{-1}$ menor a la media general (Tabla 2.9).

Los valores altos de DO se asociaron a los **métodos F** y **B** (2563 - 3000 nm y 1840 - 2563 nm, respectivamente), valores medios se asociaron al **método A** (1144 nm – 1840 nm) mientras que el **método D** se asoció a los valores bajos.

La calidad del ADN se evaluó sobre la base de la relación de absorbancias A260/A280 y porcentaje de pureza (%). Los **métodos A**, **E** y **C** extrajeron el ADN con mayor pureza manifestándose cocientes de absorbancia altos ($1,69$ - $1,92$) y mayor pureza ($93,5$ % - 106 %). El **método B** se asoció a valores medios de relación A260/A280 ($0,73$ – $1,85$) y % de pureza menores que la media general. El **método D** fue el que obtuvo valores muy bajos de pureza de ADN (0 % – 13 %) y relación A260/A280 (0 – $0,22$). En cuanto al contenido de proteínas, se observó que el **método F** se asoció valores mayores a la media general ($1,18 \mu\text{g ml}^{-1}$ > a $0,42 \mu\text{g ml}^{-1}$), el **método A** presentó valores medios, mientras que el **método C** presentó los más bajos contenidos de proteínas (0 – $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Comparación de tiempo de procesamiento, concentración, rendimiento y pureza entre las muestras de ADN extraídas de *L. theobromae* por los diferentes métodos de extracción de ADN empleados.

| Método | Variable | Media y/o rango característico | Valor-Test * Nivel de significación | Probabilidad * |
|---|---|--|--|----------------|
| MÉTODO A Ma et al. (2002) | Tiempo | 5 a 6.5 horas, ALTO | 2.92 (98%) | 0.002 |
| | Concentración de DNA | 172.95 ug/mL > media general (94.18 ug/mL) | 2.24 (96%) | 0.012 |
| | | 103.75 ug/mL - 169.7 ug/mL, MEDIA | 2.29 (96%) | 0.011 |
| | Absorbancia | 167.7 ug/mL - 255 ug/mL, ALTA | 2.29 (96%) | 0.011 |
| | | 1144 nm - 1840 nm, MEDIO | 2.03 (96%) | 0.021 |
| | Radio A260/A280 | 1.69 - 1.92, MUY ALTO | 1.84 (90%) | 0.033 |
| | | 1.79 > media general (1.36) | 1.86 (90%) | 0.032 |
| | Pureza | 93.5 % - 106 %, MUY ALTA | 1.72 (90%) | 0.043 |
| | | 96.83 % > media general (73.33 %) | 1.78 (90%) | 0.037 |
| Contenido de Proteínas | 0.4 mg/mL - 0.8 mg/mL, MEDIO | 2.03 (96%) | 0.021 | |
| MÉTODO B Gilbertson et al. (1991) modificado por Smith and Stanosz (1995) | Tiempo | 3.5 a 5 horas, MEDIO | 3.76 (99.9%) | 0.000 |
| | Concentración de DNA | 16.10 ug/mL < media general (94.18 ug/mL) | (-2.22) (96%) | 0.013 |
| | | 0 ug/mL - 41.5 ug/mL, MUY BAJA | 2.49 (96%) | 0.006 |
| | Absorbancia | 2588.33 nm > media general (1703.14 nm) | 2.18 (96%) | 0.016 |
| | | 1640 nm - 2563 nm, ALTA | 2.03 (96%) | 0.021 |
| | Radio A260/A280 | 0.725 - 1.35, MEDIO | 2.38 (96%) | 0.009 |
| Pureza | 36.83 % < media general (73.33 %) | (-2.41) (96%) | 0.008 | |
| MÉTODO C Murray and Thompson (1990) modificado por Rogers et al. (1989) and Kim et al. (1990) | Tiempo | 5 a 6.5 horas, ALTO | 2.92 (98%) | 0.002 |
| | Concentración de DNA | 33.87 ug/mL < media general (94.18 ug/mL) | (-1.72) (90%) | 0.043 |
| | Absorbancia | 630.50 nm < media general (1703.14 nm) | (-2.65) (99%) | 0.004 |
| | | 1.69 - 1.92, MUY ALTO | 1.84 (90%) | 0.033 |
| | Radio A260/A280 | 1.79 > media general (1.36) | 1.84 (90%) | 0.033 |
| | | 93.5 % - 106 %, MUY ALTA | 1.72 (90%) | 0.043 |
| | Pureza | 96.67 % > media general (73.33 %) | 1.77 (90%) | 0.038 |
| Contenido de Proteínas | 0 mg/mL - 0.15 mg/mL, MUY BAJA | 3.85 (99.9%) | 0.001 | |
| MÉTODO D Lee and Taylor (1990) | Tiempo | 3.5 a 5 horas, MEDIO | 3.76 (99.9%) | 0.000 |
| | Concentración de DNA | 13.47 ug/mL < media general (94.18 ug/mL) | (-2.30) (96%) | 0.011 |
| | | 0 ug/mL - 41.5 ug/mL, MUY BAJA | 2.49 (96%) | 0.006 |
| | Absorbancia | 0 nm - 387 nm, MUY BAJA | 2.29 (96%) | 0.011 |
| | | 0.33 < media general (1.36) | (-4.48) (99.9%) | 0.000 |
| | Radio A260/A280 | 0 - 0.226, MUY BAJA | 3.76 (99.9%) | 0.000 |
| | | 16.50 % < media general (73.33 %) | (-3.83) (99.9%) | 0.000 |
| Pureza | 0 % - 13 %, MUY BAJA | 3.04 (98%) | 0.001 | |
| Contenido de Proteínas | 0.4 mg/mL - 0.8 mg/mL, MEDIO | 2.03 (96%) | 0.021 | |
| MÉTODO E Qiagen Dneasy Plant Mikit | Tiempo | 3.5 a 5 horas, MEDIO | 5.21 (99.9%) | 0.000 |
| | Radio A260/A280 | 1.69 - 1.92, MUY ALTO | 1.84 (96%) | 0.033 |
| | Pureza | 101.83 % > media general (73.33 %) | 1.99 (96%) | 0.023 |
| 93.5 % - 106 % MUY ALTA | | 2.69 (99%) | 0.004 | |
| MÉTODO F Raeder and Broda (1995) modificado por Slippers et al. [comunicación personal] | Tiempo | 5 a 6.5 horas, ALTO | 2.92 (98%) | 0.002 |
| | Concentración de DNA | 209.97 ug/mL > media general (94.18 ug/mL) | 3.30 (99%) | 0.000 |
| | | 266 ug/mL - 315.9 ug/mL, MUY ALTA | 3.08 (99%) | 0.001 |
| | Absorbancia | 2563 nm - > 3000 nm, MUY ALTA | 2.03 (96%) | 0.021 |
| Contenido de Proteínas | 1.18 mg/mL > media general (0.42 mg/mL) | 2.60 (99%) | 0.005 | |

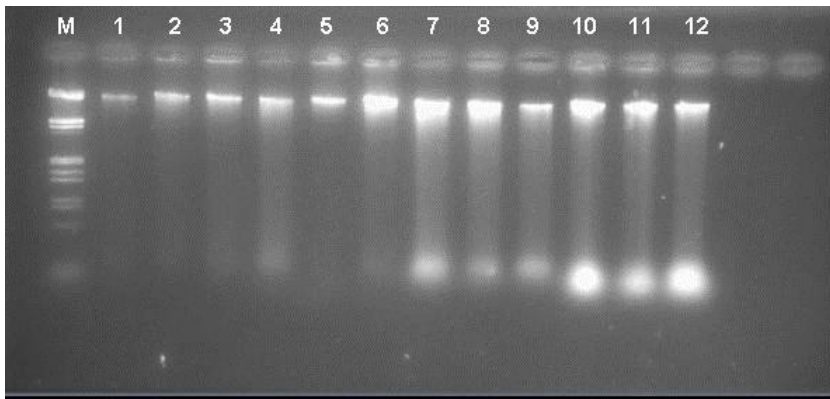


Figura 2.13. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de *L. theobromae* extraído por el **método A** (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y **método E** (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, primera columna de la izquierda).

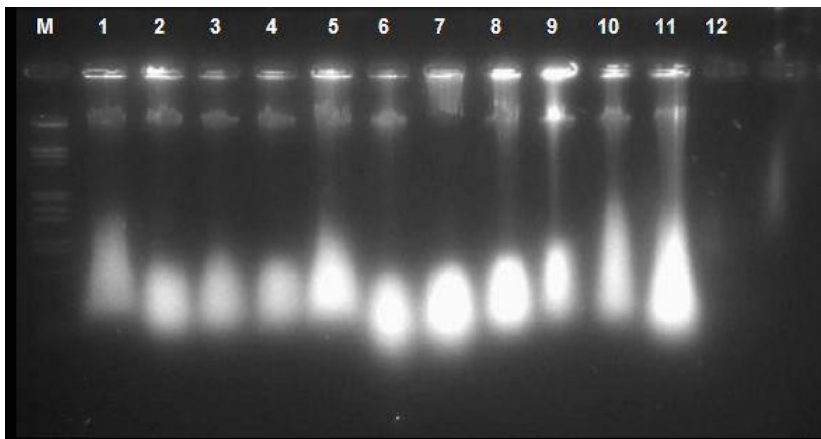


Figura 2.14. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de *L. theobromae* extraído por el **método B** (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y **método D** (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, primera columna de la izquierda).

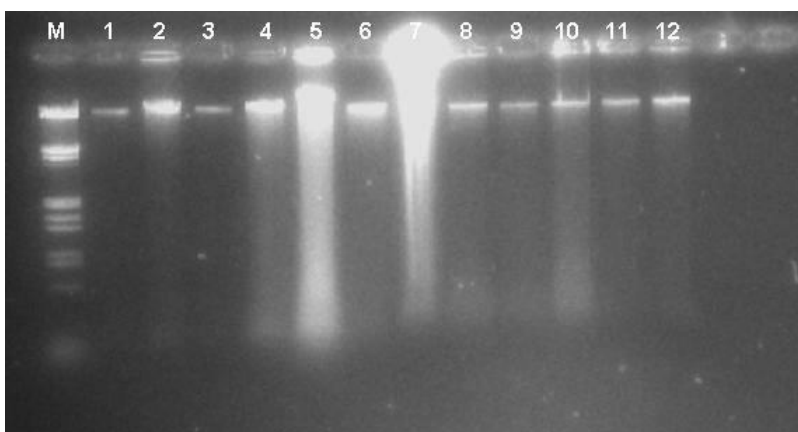


Figura 2.15. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio para la verificación de la calidad y cantidad del ADN de *L. theobromae* extraído por el **método C** (columnas 1 a 6 de izquierda a derecha) y **método F** (columnas 7 a 12) comparados con 100 mg de ADN de λ no digerido (M, Primera columna de la izquierda).

Los métodos modificados por Ma *et al.* (2002) (**Método A**), y el kit comercial de extracción (**Método E**), se seleccionaron en base a los resultados obtenidos, como los mejores métodos, ya que proporcionaron mayor concentración y mejor calidad de ADN.

Con la aplicación del kit comercial se redujo el tiempo de extracción y el nivel de toxicidad por el menor uso de sustancias peligrosas, además, se realizó la extracción simultánea de ADN de un número mayor de muestras, aunque su costo fue elevado. Por otro lado, con el método Ma *et al.* (2002) se obtuvo mayor cantidad de ADN puro, sin embargo, requirió mayor manipulación y tiempo de procesamiento. A diferencia del kit de extracción, resultó ser un procedimiento económico. La utilización de ambos métodos de extracción estuvo supeditada a la variable económica.

Extracción, cuantificación de ADN genómico obtenido de aislamientos de *Botryosphaeriaceae* y amplificación de regiones ITS, B-TUBULINA Y NL4 mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las metodologías de extracción empleando el Kit Qiagen para el total de 74 aislamientos de *Botryosphaeriaceae* puros obtenidos logró ADN de buena calidad. Se cuantificó por espectrofotometría y se obtuvieron rangos de ADN entre 562,8 ng μl^{-1} y 119,2 ng μl^{-1} . El promedio de la relación de absorbancia 260/280 obtenida estuvo comprendida entre 1,3 y 2,0, considerada apropiada para estudios genéticos que requieran ADN de calidad. Las amplificaciones por PCR de la región ITS del ADN ribosomal, de la región β -tubulina y de NL4, se verificaron en geles de agarosa al 1,2 % teñidos con bromuro de etidio. Se estandarizaron los reactivos de PCR, tomando algunas muestras a las que se modificaron concentraciones, hasta encontrar la óptima de MgCl_2 y Taq-ADN polimerasa.

En el caso de ITS, las amplificaciones resultaron ser satisfactorias, aunque se produjeron fragmentos únicos (bandas) de aproximadamente 580 pb. No se observó polimorfismo en el tamaño de los fragmentos entre los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* evaluados, de manera que no resultó útil para la separación a este nivel taxonómico y evidenció una gran similitud existente entre algunas especies en estudio. La identificación por PCR a partir de los cebadores Bt2a y Bt2b, como también para la región NL4 con los cebadores ITS1 y NL4 no siempre fue posible ya que mostró ausencia de productos amplificados, por lo que no se obtuvieron resultados. En los casos que en los que la amplificación fue positiva, se amplificó un fragmento único de 450 pb y 1200 pb (pares de bases) respectivamente e indicando monomorfismo, al igual que con ITS.

Restricción enzimática

Los productos PCR de la región ITS de 30 aislamientos representativos de los grupos tipo morfológicos (A,B,C,D y E) y también los patrones *Neofusicoccum luteum*, *Lasiodiplodia*

theobromae, *Diplodia mutila*, *D. seriata* y *Botryosphaeria dothidea*, fueron digeridos con 5 enzimas de restricción: *AluI*, *HaeIII*, *CfoI*, *NciI* y *Taq*, y resultaron fragmentos de los tamaños esperados, observándose polimorfismo entre los aislamientos.

Se produjeron fragmentos de distinta longitud, encontrándose de 1 a 4 bandas por aislamiento. La Figura 2.16. ilustra los patrones obtenidos de la digestión enzimática y los perfiles de restricción observados para cada una de las enzimas estudiadas.

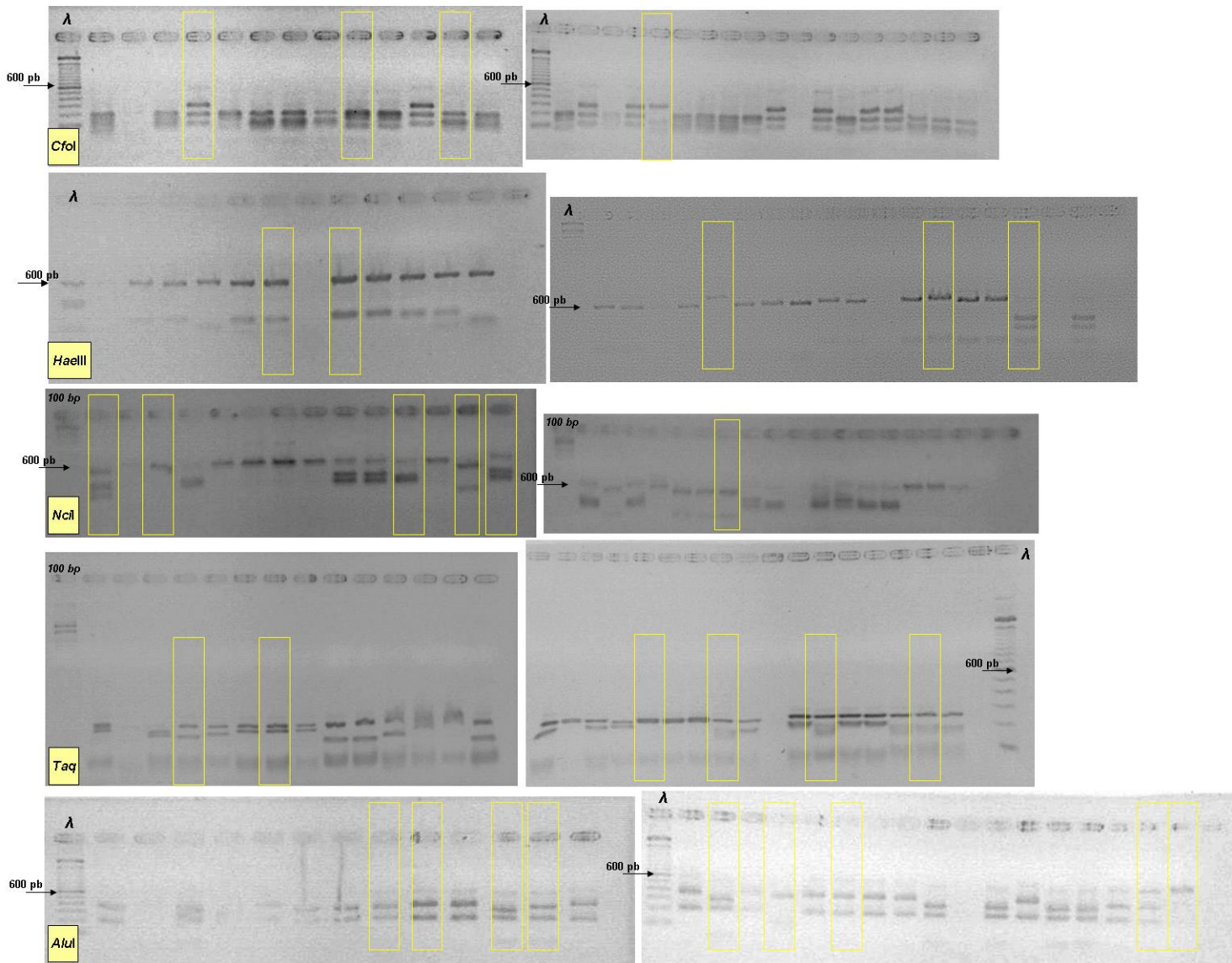


Figura 2.16. Geles de agarosa al 1,2 % teñidos con bromuro de etidio donde se observan los productos amplificados del ITS del ADN ribosomal, de aislamientos de *Botryosphaeriaceae*, luego de su restricción con las enzimas *CfoI*, *HaeIII*, *NciI*, *Taq* y *AluI*. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Lambda y 100 bp y se señalaron los perfiles de restricción definidos para cada enzima, con un recuadro amarillo.

Con la digestión de la enzima *CfoI* se obtuvieron cuatro patrones de restricción diferentes (designados con letras A, B, C y D). Con la enzima *HaeIII* se generaron cinco patrones diferentes (A, B, C, D y E), *NciI* y *TaqI* generaron seis (A, B, C, D, E y F).

La digestión realizada con la enzima *AluI* fue la que tuvo mayor número de bandas de distintos pesos moleculares comparada con las otras enzimas, generando nueve patrones de bandas diferentes para los aislamientos estudiados (A, B, C, D, E, F, G, H e I). Estos patrones de restricción para cada enzima y la distribución de los aislamientos se muestran en la Figura 2.17.

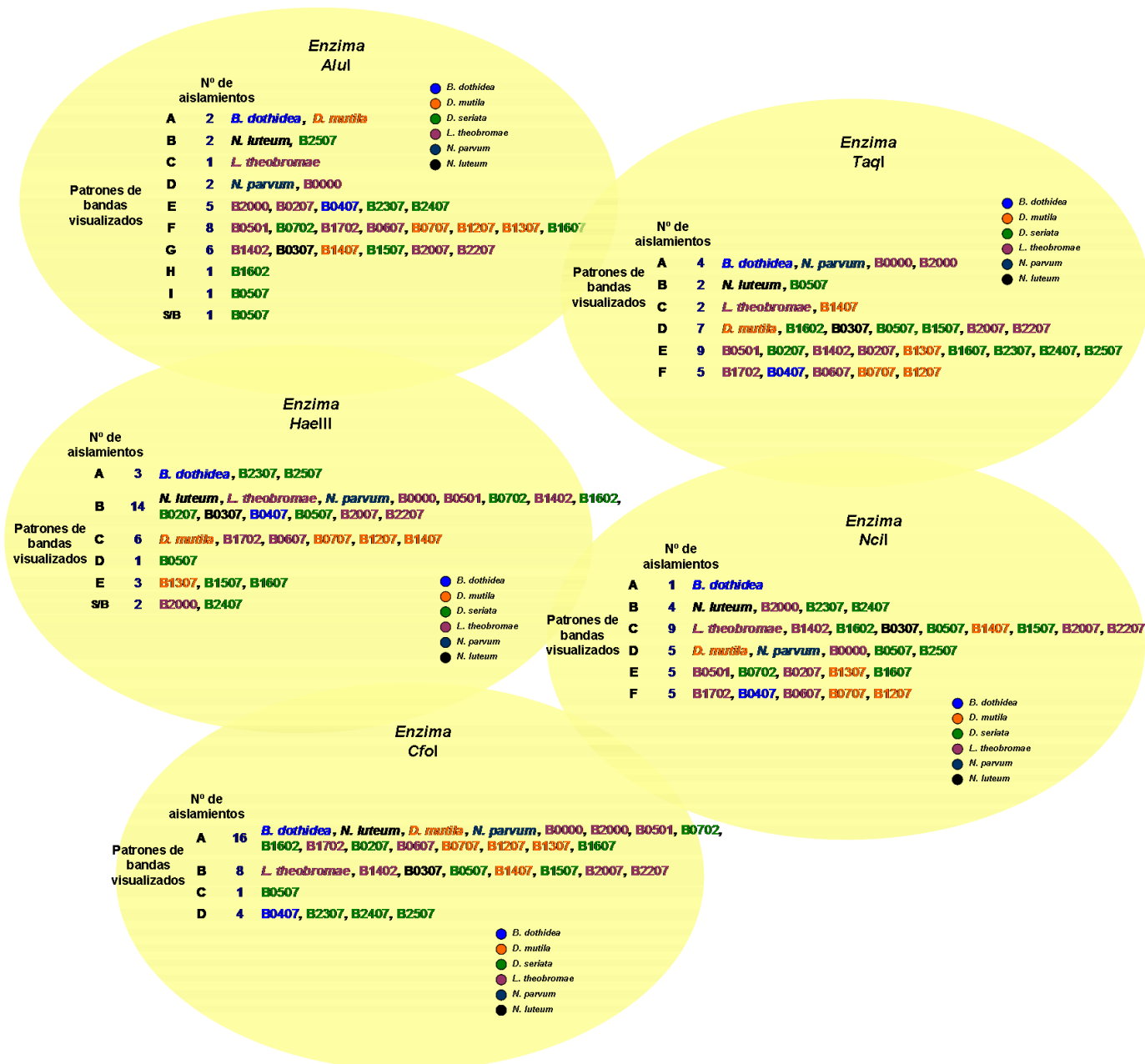


Figura 2.17. Patrones de restricción de los productos amplificados del ITS del ADN ribosomal de aislamientos de *Botryosphaeriaceae*, para cada enzima y distribución de los aislamientos identificados.

El dendrograma de UPGMA (Figura 2.18) mostró una agrupación en 5 grupos definidos, con una 66% de similitud. En la descripción de estos grupos, se observaron inconsistencias con las caracterizaciones morfológicas debido a que se agruparon patrones identificados diferentes y además, agrupó aislamientos que corresponden a distintas especies.

Los aislamientos B0307 y B0707 son agrupados a pesar de que, el primero corresponde a *N. luteum* y el segundo corresponde a *D. mutila*, según las características morfológicas. Por otro lado, los aislamientos B2407, B2507 que corresponden a *D. seriata*, son agrupados al aislamiento B2207 que corresponde a *L. theobromae* según las características conidiales.

Por otro lado, cuando se consideró el 81,8 % de similitud, el dendrograma de UPGMA (Figura 2.18) mostró una agrupación en 12 grupos definidos. En este caso, se observó que si bien se logró agrupar las mismas especies identificadas, en algunos grupos la identificación de especies de *Botryosphaeriaceae* no fue consistente con la agrupación.

El análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos por las restricciones de la región ITS del ADN ribosomal, no agrupó los aislamientos dentro de los “grupos tipo” definidos en los estudios morfológicos y además, no fue concluyente en cuanto a la diferenciación de especies del género *Botryosphaeriaceae* al comparar con los patrones utilizados. Sin embargo, al observar los perfiles electroforéticos es posible deducir la existencia de dos o incluso más especies en Argentina.

Secuenciación e identificación de especies

Se secuenciaron los espacios internos transcritos internos ITS del ADN ribosomal de 21 aislamientos seleccionados para llegar a una identificación definitiva. Las secuencias obtenidas de los productos purificados de PCR de las regiones ITS de los aislamientos seleccionados en función de los estudios morfológicos: *L. theobromae* (B6211, B4809, B0207, B3596, B0000), *Diplodia seriata* (B1507, B 3309, B2107 y B4009), *D. mutila* (B4609, B0707, B1307, B4409), *N. luteum* (B0301, B0307, B1807, B3107) y *B. dothidea* (B0407, B1007, B2907, B3007) fueron editadas y analizadas por BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) en el GenBank (National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)) y se muestran en la Figura 2.19. La longitud de las secuencias obtenidas varió de 503 a 588 pares de bases.

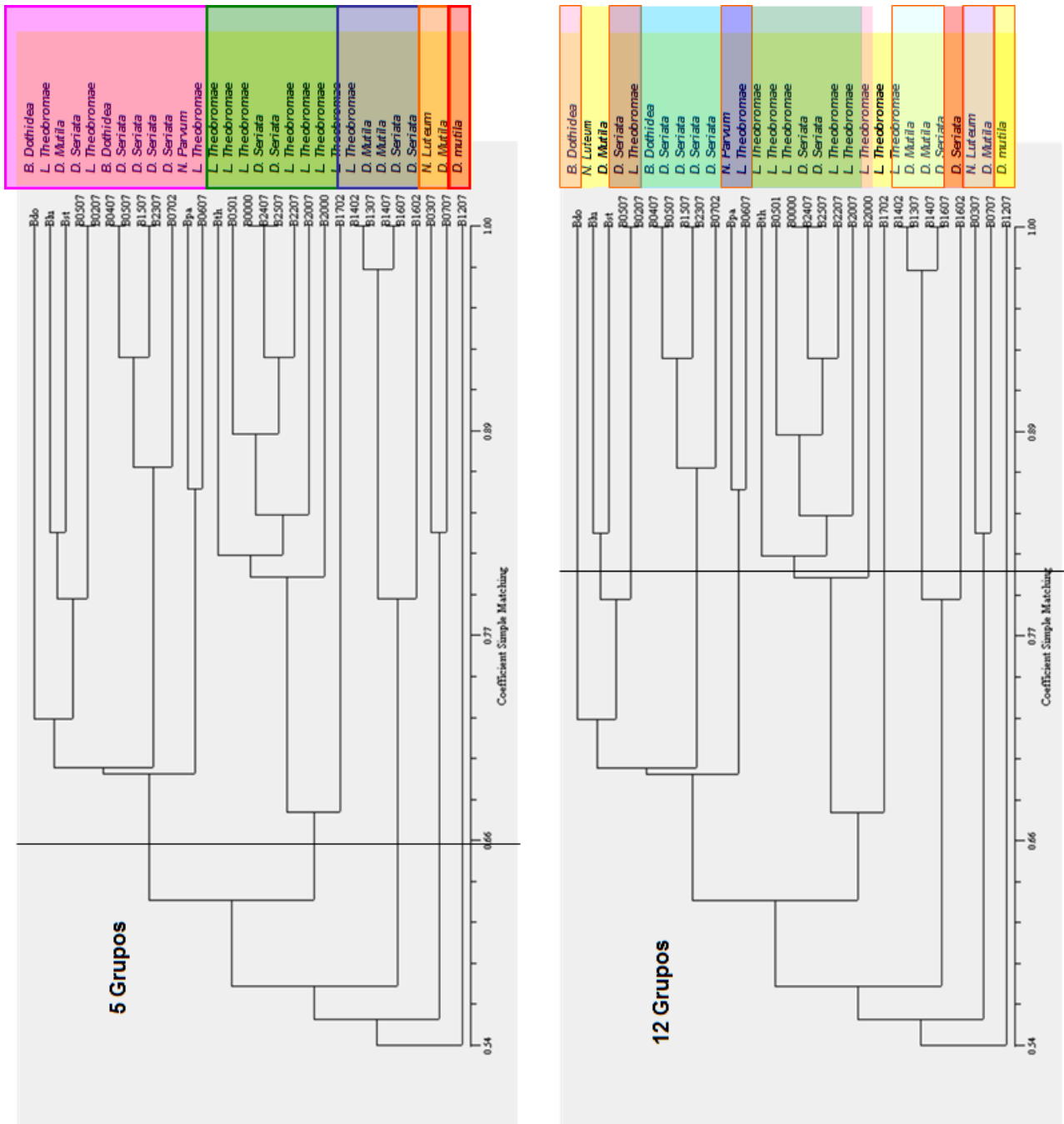


Figura 2.18. Dendrogramas obtenidos a partir de la restricción enzimática de los productos de la amplificación de fragmentos específicos del ADN ribosomal de aislamientos de *Botryosphaeriaceae*. En el dendrograma superior, se ilustran cinco grupos con el 66% de similitud y en el dendrograma inferior se ilustran 12 grupos con el 81,8% de similitud, según el coeficiente de similitud Simple Matching.

B0000 *Lasiodiplodia theobromae* (588 pb)
 cgnncgactctnnccttggtaacgtactctgttggcggctccggccgcnnaaggacctcaaacctcagtcagtaacgcagacgtctgataaacaagtaataaa
 ctaaaactttcaacaacggatctctggcttggcctcgcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaagtgaattgcagaattcagtgaaatcgcgaatcttgaannnannattgc
 gcccttggatctcggggggcagcctgttcgagcgtcattcaaacctcaagctctgcttggaaattggcaccctcctcagtcggacgcgcctcaagacctcggcgtgctgtt
 cagccctcaagcgtagtagaatacaccctcgttggagcggttggcgtcgcgccggacgaacctctgaactttcaaggttgacctggatcaggtagggataccgctgaa
 cttaaagcatatcaataannngnnnnnnnncattaccgagtttccnactccggctcnaactctcnncttngngaacgtacctgttggcttggcggctcngcccaanggnctca
 aactc

B1507 *Diplodia seriata* (555 pb)
 tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaccgagttctgggctcggctcgaatctcccacccttggtaacatacctgttggcttggcggctcttggcgcgaggaggccctcg
 cgggcccccccgcccttccagaggacctcaaacctcagtcagtaacgtcagctctgataaacaagtaataaaactaaaacttcaacaacggatctcttggcttggcctcg
 atgaagaacgcagcgaatgcgataagtaagtgaattgcagaattcagtgaaatcgcgaatcttgaacgcacattgcgcccttgcaatccggggggcctgctgttcgagc
 gtcattacaaccccaagctctgttggattggcggcctcctctgaggacgccttaaagacctcggcgggtgctgtcagccctcaagcgtagtagaatacaccctccttgg
 gagcggttggcgtcggccggacgaacctctgaactttcaaggttgacctggatcagtagggataccggcgtacttaagcatatcaataagcggaggga

B1307 *Diplodia mutila* (538 pb)
 tccgtaggtgaacctgcggaaggacgagttctgggctcggccgaatctcccacccttggtaacatacctgttggcttggcggctcttggcgcgaggaggccctcaaaagc
 cccccgcgcttccgagaggacctcaaacctcagtcagtaaacgtcagctctgaaaaacaagtaataaaactaaaacttcaacaacggatctcttggcttggcctcg
 agccgaaatgcgataagtaagtgaattgcagaattcagtgaaatcgcgaatcttgaacgcacattgcgcccttggcattccgaggggcctgctgttcgagcgtcattacaag
 ctctgttggatggggcgcctcgcggacgcgcctcaaaagacctcggcgggtgctgtcagccctcaagcgtagtagaatacaccctccttggaggttggcgtcggccgc
 gaacctctgaactttcaaggttgacctcggatcagtagggataccggcgtacttaagcatatcaataagcggaggagataccggc

B0307 *Neofusicoccum luteum* (528 pb)
 tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaccgagttgattcagctcgcctcgaactctcccacccttggtaacatacctgttggcttggcggcggctctcccagccccgttggg
 gggccggccagcggccgaccacaactcagtcgtaaacgtcagctctgagaaacaggttaataaaactaaaacttcaacaacggatctcttggcttggcctcagtagaagaac
 gcagcgtatcgataaagtgaatgcagaattcagtgaaatcgcgaatcttgaacgcacattgcgcccttggatccgaggggcctgctgttcgagcgtcattcaacccca
 gcttggatggggcctcgtccttggaggcgcctcgaagacctcggcgggtgctgtcctcaagctagtagaanaaacctcgggagcgcacggcgtcggccgggacgaa
 ctttgaattttctcaaggttgacctcggatcagtagggataccgctgaacttaagatataaagcggaggga

B0407 *Botryosphaeria dothidea* (anamorfo *Fusicoccum aesculi*) (503 pb)
 ggaaggataaacgagtgattcgggctcggcccgatctcccacccttggtaacatacctgttggcttggcggcggctcctcggcggcggccccctcccgggggggtg
 ccagcggccgagaggaccatcaactagtcagtaaacgatcagctctgaaaaacatttaataaaactaaaacttcaacaacggatctcttggcttggcctcagtagaagaacg
 cagcgaatgcgataagtaagtgaattgcaaaactcagtgaaatcgcgaatcttgaacgcacatgccccttggatccgaagggctcctcagcgtcattacaaccccaag
 ctctgttggatgggacacgctccttccggcggcgcctcaaaagacctcggcgggtgctgtcctcaagcgtagtagaatacactcgtcggagcgcaggggcctcggccg
 cggacgaactctgaacttctcaaggttgacctcggat

Figura 2.19. Secuencias obtenidas con los primers ITS1-4, de aislamientos representativos de los cuatro grupos “tipo” caracterizados morfológicamente: B0301 (*Neofusicoccum luteum*), B1507 (*Diplodia seriata*), B1307 (*Diplodia mutila*), B0407 (*Botryosphaeria dothidea*, anamorfo *Fusicoccum aesculi*) y B0000 (*Lasiodiplodia theobromae*).

Las Figuras 2.20 a 2.24 ilustran los alineamientos de las secuencias de B0000, B1507, B1307, B0307, B0407 con una o más de las secuencias confrontadas del GenBank, tomando, a los efectos de la identificación, el primer resultado del FASTA realizado por el BLASTn, correspondiendo a IKF814723 (*L. theobromae*), IDQ356355 (*D. seriata*), IEU030326 (*D. mutila*), IHQ392717 (*N. luteum*) y IDQ233602 (*B. dothidea*), respectivamente.

Sequence ID: [gb|KF814723.1](#) Length: 1005 Number of Matches: 2

Range 1: 27 to 620 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|------------|-----------|
| 913 bits(494) | 0.0 | 554/594(93%) | 11/594(1%) | Plus/Plus |
| Query 6 | CGACTCTNCNNCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCNAAGG | 65 | | |
| Sbjct 27 | CGACTCTCCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGG | 86 | | |
| Query 66 | ACCTTCAAACTCCAGTCAGT-AACGCAGACGCTCTGATAAACAAAGTTAATAAACTAAAACT | 124 | | |
| Sbjct 87 | ACCTTCAAACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGCTCTGATAAACAAAGTTAATAAACTAAAACT | 146 | | |
| Query 125 | TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG-AATGCGATAAGTA | 183 | | |
| Sbjct 147 | TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA | 206 | | |
| Query 184 | ATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGaaannnanaTTGCGCCCCTTGGT | 243 | | |
| Sbjct 207 | ATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGT | 266 | | |
| Query 244 | ATTCCGGGGGGCA-GCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGG | 302 | | |
| Sbjct 267 | ATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGG | 326 | | |
| Query 303 | GCACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGC-GTGGCTGTTTCAGCCCTCAAG | 361 | | |
| Sbjct 327 | GCACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAG | 386 | | |
| Query 362 | CGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGA | 421 | | |
| Sbjct 387 | CGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGA | 446 | | |
| Query 422 | ACTTTT-ICAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAICAA | 480 | | |
| Sbjct 447 | ACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAICAA | 506 | | |
| Query 481 | TAANN--GGnnnnnnnCATTACCGAGTTTTTCNA-CTCCGGCTCNACTCTCCNNCN-ITTG | 536 | | |
| Sbjct 507 | TAGGCCGGGAGGAAATCATTACCGAGTTTTTCGAGCTTCGGCTCGACTCTCCACCCTTTG | 566 | | |
| Query 537 | NGAACGTACCTCTGTGCTTTGGCGGC-TCNGCCGCCAANGGNC-ITCAAACCTC | 588 | | |
| Sbjct 567 | TGAACGTACCTCTGTGCTTTGGCGGCTTCGGCCGCCAANGGACCTTCAAACCTC | 620 | | |

Figura 2.20. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino *B0000* y la accesion IKF814723 del GenBank (*Lasiodiplodia theobromae*).

Sequence ID: [gb|DQ356355.1](#) Length: 563 Number of Matches: 1

▶ [See 3 more title\(s\)](#)

Range 1: 4 to 563 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 990 bits(536) | 0.0 | 553/560(99%) | 5/560(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTCTCGGGCTTCGGCTCGAATCTCC | | | 60 |
| Sbjct 4 | TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTCTCGGGCTTCGGCTCGAATCTCC | | | 63 |
| Query 61 | CACCCTTTGTGAACATACTCTGTTGCTTTGGCGGCTCTTTGCCGCGAGGAGGCCCTCGC | | | 120 |
| Sbjct 64 | CACCCTTTGTGAACATACTCTGTTGCTTTGGCGGCTCTTTGCCGCGAGGAGGCCCTCGC | | | 123 |
| Query 121 | GGGcccccccGCGC--TTTC--CCAGAGGACCTTCAAACCTCCAGTCAGT-AACGTCGACG | | | 175 |
| Sbjct 124 | GGGCCCCCCC GCGGCTTTCTGCCAGAGGACCTTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTCGACG | | | 183 |
| Query 176 | TCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG | | | 235 |
| Sbjct 184 | TCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG | | | 243 |
| Query 236 | ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA | | | 295 |
| Sbjct 244 | ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA | | | 303 |
| Query 296 | AICTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAT | | | 355 |
| Sbjct 304 | AICTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAT | | | 363 |
| Query 356 | TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCTCTCTGCGGACGCGCCTTAAAG | | | 415 |
| Sbjct 364 | TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCTCTCTGCGGACGCGCCTTAAAG | | | 423 |
| Query 416 | ACCTCGGCGGTGGCTGTTTCCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGT | | | 475 |
| Sbjct 424 | ACCTCGGCGGTGGCTGTTTCCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGT | | | 483 |
| Query 476 | TGGCGTCGCCC GCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTA | | | 535 |
| Sbjct 484 | TGGCGTCGCCC GCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTA | | | 543 |
| Query 536 | GGGATACCCGCTGAACTTAA 555 | | | |
| Sbjct 544 | GGGATACCCGCTGAACTTAA 563 | | | |

Figura 2.21. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino *B1507* y la accesion IDQ356355 del GenBank (*Diplodia seriata*).

Sequence ID: [gb|EU030326.1](#) Length: 557 Number of Matches: 1

Range 1: 19 to 557 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|------------|-----------|
| 830 bits(449) | 0.0 | 513/539(95%) | 24/539(4%) | Plus/Plus |
| Query 24 | ACCGAGTTCTCGGGCTTCGGCCCGAATCTCCCACCCTTTGTGAACATAACCTCTGTTGCTT | | | 83 |
| 3bjct 19 | ACCGAGTTCTCGGGCTTCGGCCCGAATCTCCCACCCTTTGTGAACATAACCTCTGTTGCTT | | | 78 |
| Query 84 | TGGCGGCTCTTGCCCGTGGAGGCCCTCAAAAGccccccccGCGCGCTTCGCCAGAGGAC | | | 143 |
| 3bjct 79 | TGGCGGCTCTTGCCCGTGGAGGCCCTCAAAAGCCCCCGCGCGCTTCGCCAGAGGAC | | | 138 |
| Query 144 | CTTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTCGACGCTCGAAAAACAAGTTAATAAACTAAACTTT | | | 203 |
| 3bjct 139 | CTTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTCGACGCTCGAAAAACAAGTTAATAAACTAAACTTT | | | 198 |
| Query 204 | CAACAACGGATCTCTTGGT-----TCGATGAAGAACGC--CGAAATGCGATAAGTAAT | | | 254 |
| 3bjct 199 | CAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT | | | 258 |
| Query 255 | GTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGCAT | | | 314 |
| 3bjct 259 | GTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGCAT | | | 318 |
| Query 315 | TCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT-----CAAGCTCTGCTTGGTATTGGGC | | | 367 |
| 3bjct 319 | TCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGC | | | 378 |
| Query 368 | GCCGTC----CTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGCG | | | 423 |
| 3bjct 379 | GCCGTCCTCTCTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGCG | | | 438 |
| Query 424 | TAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGTGGTTGGCGTCGCCCGC----CGAACCTTCTGAAC | | | 479 |
| 3bjct 439 | TAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGTGGTTGGCGTCGCCCGCGGACGAACCTTCTGAAC | | | 498 |
| Query 480 | TTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCGTAACTTAAGCATATCAAT | | | 538 |
| 3bjct 499 | TTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAT | | | 557 |

Figura 2.22. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino *B1307* y la accesion IEU030326 del GenBank (*Diplodia mutila*).

Sequence ID: [gb|HQ392717.1](#) Length: 557 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 557 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|-------------------------------|-----------|
| 782 bits(423) | 0.0 | 518/556(93%) | 38/556(6%) | Plus/Plus |
| Query 11 | ACCTGCGG-A-GATCATT | CGAGTTGATT | CGAGCTCC-GCTCGACTCTCCACCCCAT- | 65 |
| Sbjct 2 | ACCTGCGGAAGGATCATT | ACCGAGTTGATT | CGAGCTCCGGCTCGACTCTCCACCCCATG | 61 |
| Query 66 | TGTACCTA-CTCTGTTGC-TTGGCGGGCCGCGGTCTCTCC---CCGACCCCGTTCCGGGGG | | | 120 |
| Sbjct 62 | TGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCTCCGACCCGACCCCGTTCCGGGGG | | | 121 |
| Query 121 | GCCGGCCAGCGCCCG-----ACCAC--AACTCCAGTC-GTAAACGTCGCAGTCTGAGA | | | 170 |
| Sbjct 122 | GCCGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCACAAAACCTCCAGTCAGTAAACGTCGCAGTCTGAGA | | | 181 |
| Query 171 | AACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA | | | 230 |
| Sbjct 182 | AACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA | | | 241 |
| Query 231 | ACGCAGCGA--TGCGAT-A-TAATGTGAA-TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG | | | 285 |
| Sbjct 242 | ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG | | | 301 |
| Query 286 | AACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCC-GITCGAGCGTCATTTCAACC | | | 344 |
| Sbjct 302 | AACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTTCAACC | | | 361 |
| Query 345 | CTCAAGCT---CTTGGTATTGGGCTCCGTCTCTGTGGA-GCGCCTCGAAGACCTCGGCG | | | 400 |
| Sbjct 362 | CTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCTCTGTGGACGCGCCTCGAAGACCTCGGCG | | | 421 |
| Query 401 | GTGGCGICT-GCCTCAAGC-TAGTAGAAAACACCTCG----GGAGCGCACGGCGTCG-CC | | | 453 |
| Sbjct 422 | GTGGCGICTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGTCGCCC | | | 481 |
| Query 454 | GCCGGACGAACCTTTGAATTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT | | | 513 |
| Sbjct 482 | GCCGGACGAACCTTTGAATTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT | | | 541 |
| Query 514 | GAACTTAAG-ATAATCA | 528 | | |
| Sbjct 542 | GAACTTAAGCATAATCA | 557 | | |

Figura 2.23. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino *B0307* y la accesion IHQ392717 del GenBank (*Neofusicoccum luteum*).

Range 1: 15 to 534 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------------------------------|------------|-----------|
| 850 bits(460) | 0.0 | 503/520(97%) | 17/520(3%) | Plus/Plus |
| Query 1 | GGAAGGATCA--A-CGAGTTGATT | CGGGCTCCGGCCCGATCCTCCCACCCTTTGTGTACC | | 57 |
| Sbjct 15 | GGAAGGATCATTACCGAGTTGATT | CGGGCTCCGGCCCGATCCTCCCACCCTTTGTGTACC | | 74 |
| Query 58 | TA-CTCTGTTGCTTTGGC-GGCCGCGGTCT | CCGCGGCCGGCCCCCTCCCCGGGGGGTG | | 115 |
| Sbjct 75 | TACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCT | CCGCGGCCGGCCCCCTCCCCGGGGGGTG | | 134 |
| Query 116 | GCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATCAA | ACT--AGTCAGTAAACGATGCAGTCTGAAAAACA | | 173 |
| Sbjct 135 | GCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATCAA | ACTCCAGTCAGTAAACGATGCAGTCTGAAAAACA | | 194 |
| Query 174 | TTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGA | -CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA | | 232 |
| Sbjct 195 | TTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGA | TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA | | 254 |
| Query 233 | GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA | -AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC | | 291 |
| Sbjct 255 | GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA | GAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC | | 314 |
| Query 292 | ACA-TGCGCCCTTTGGTATTCGGAAGGGC | -TGCC---TCGAGCGTCATTACAACCTCAA | | 346 |
| Sbjct 315 | ACATTGCGCCCTTTGGTATTCGGAAGGGC | ATTCGAGCGTCATTACAACCTCAA | | 374 |
| Query 347 | GCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTT | -CGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGC | | 405 |
| Sbjct 375 | GCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTT | GCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGC | | 434 |
| Query 406 | GTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAACATA | CA-CTCGCTTCGGAGCGCAGGGCGTCGCCCGCC | | 464 |
| Sbjct 435 | GTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAACATA | CACTCGCTTCGGAGCGCAGGGCGTCGCCCGCC | | 494 |
| Query 465 | GGACGAACCTTCTGAAC-TTTCTCAAGGTTGACCTCGGAT | | 503 | |
| Sbjct 495 | GGACGAACCTTCTGAAC-TTTCTCAAGGTTGACCTCGGAT | | 534 | |

Figura 2.24. Alineamiento parcial de secuencias obtenidas con los primers ITS1-4 correspondientes al aislamiento argentino B0407 y la accesion IDQ233602 del GenBank (*Botryosphaeria dothidea* anamorfo *Fusicoccum aesculis*).

La secuenciación de productos amplificados purificados y posterior comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos GenBank, permitió identificar de forma concluyente, los aislamientos de los grupos tipo que no esporularon y se identificaron por metodos morfológicos, considerando una identificación definitiva cuando los porcentajes de homología (identificación) estuvieron comprendidos entre el 91 % y el 99 %.

En la Tabla 2.10 se resumieron los aislamientos estudiados y su comparación por comparación con accesiones de la base de datos del GenBank, con probabilidades de alineamiento menores a 0,005 por lo que resultaron significativos y no son debidos al azar.

Además, se obtuvieron porcentajes, de cada secuencia problema alineada con las accesiones, superiores a 87 % hasta el 100 %.

Los resultados obtenidos permitieron la identificación de las secuencias de cepas aisladas de la familia *Botryosphaeriaceae*, provenientes de viñedos argentinos a partir de plantas con síntomas

de hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes, las cuales pertenecen a: *L. theobromae*, *D. seriata*, *D. mutila*, *N. luteum* y *B. dothidea*.

Tabla 2.10. Identificación de las secuencias obtenidas de 21 aislamientos de *Botryosphaeriaceae* por comparación en la base de datos del GenBank: identificación de aislamientos argentinos secuenciados, procedencia e identificación de especie obtenida, número de acceso en la base de datos del GenBank, p-value del alineamiento (p<0,005 es significativo), % de la secuencia de cada aislamiento argentino que es alineado con la accesión y porcentaje de similitud con las secuencias contrastadas, que establece la identificación de cada especie.

| Aislamientos argentinos secuenciados | Zona vitícola de procedencia | Identificación de especie de <i>Botryosphaeriaceae</i> | Nº de acceso en GenBank | p-value del alineamiento | % de la secuencia alineado con la accesión | % de similitud |
|--------------------------------------|------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|--|----------------|
| B6211 | Zonda, San Juan | <i>L. theobromae</i> | KF814723.1 | 0,000 | 98 | 92 |
| B4809 | Pocito, San Juan | <i>B. rhodina</i> (anam. <i>L. theobromae</i>) | KF910765.1 | 0,000 | 87 | 95 |
| B0207 | Luján de cuyo, Mendoza | <i>L. theobromae</i> | JF923830.1 | 0,000 | 87 | 95 |
| B3509 | El Puesto, Catamarca | <i>L. theobromae</i> | KM357559.1 | 0,000 | 98 | 91 |
| B0000 | Luján de cuyo, Mendoza | <i>L. theobromae</i> | JF923831.1 | 0,000 | 87 | 94 |
| B1507 | Maipú, Mendoza | <i>D. seriata</i> | HQ629955.1 | 0,000 | 100 | 99 |
| B3309 | Tinogasta, Catamarca | <i>D. seriata</i> | DQ458889.1 | 0,000 | 100 | 99 |
| B2107 | San Rafael, Mendoza | <i>D. seriata</i> | KF535904.1 | 0,000 | 99 | 99 |
| B4009 | Vichigasta, Catamarca | <i>D. seriata</i> | DQ356355.1 | 0,000 | 100 | 99 |
| B4609 | El Puesto, Catamarca | <i>D. mutila</i> | DQ458887.1 | 0,000 | 98 | 93 |
| B0707 | Luján de cuyo, Mendoza | <i>D. mutila</i> | EU030326.1 | 0,000 | 92 | 95 |
| B1307 | Tunuyán, Mendoza | <i>D. mutila</i> | AY259093.2 | 0,000 | 98 | 94 |
| B4409 | La Puntilla, Catamarca | <i>D. mutila</i> | EU856765.1 | 0,000 | 97 | 94 |
| B0301 | Luján de cuyo, Mendoza | <i>N. luteum</i> | JN543668.1 | 0,000 | 98 | 93 |
| B0307 | Luján de cuyo, Mendoza | <i>N. luteum</i> | JF271764.1 | 0,000 | 97 | 93 |
| B1807 | Lavalle, Mendoza | <i>N. luteum</i> | HQ392717.1 | 0,000 | 98 | 92 |
| B3107 | San Rafael, Mendoza | <i>N. luteum</i> | HQ392719.1 | 0,000 | 95 | 93 |
| B0407 | Maipú, Mendoza | <i>B. Dothidea</i> (<i>F. aesculis</i>) | KJ638322.1 | 0,000 | 97 | 97 |
| B1007 | Albardón, San Juan | <i>B. Dothidea</i> (<i>F. aesculis</i>) | KC467063.1 | 0,000 | 100 | 97 |
| B2907 | San Rafael, Mendoza | <i>B. Dothidea</i> (<i>F. aesculis</i>) | JQ404499.1 | 0,000 | 97 | 97 |
| B3007 | San Rafael, Mendoza | <i>B. Dothidea</i> (<i>F. aesculis</i>) | DQ2336602.1 | 0,000 | 100 | 97 |

2.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El declinamiento de vides, está asociado en todo el mundo, a especies de *Botryosphaeriaceae*. En esta tesis, se identificaron 76 aislamientos a partir de plantas creciendo en distintas regiones vitícolas argentinas, que presentaban síntomas de hoja de malvón y declinamiento de vides jóvenes, confirmando la primer hipótesis: las especies de *Botryosphaeriaceae* integran una comunidad y están comúnmente diseminadas en los viñedos de las distintas regiones agroclimáticas argentinas donde se realiza el cultivo de la vid, causando decaimiento y muerte de plantas. Algunas de estas especies, se encuentran como endógenas o latentes en la madera de la vid, son oportunistas y, en condiciones de estrés o cuando se incrementan los cambios climáticos, provocan síntomas de las enfermedades asociadas (Slippers y Wingfield, 2007a).

El 100% de los aislamientos, se obtuvo en su forma anamórfica (asexual), corroborando la reducida cantidad de teleomorfos (formas sexuales) que pueden encontrarse en la naturaleza, en coincidencia con los resultados obtenidos por Shoemaker (1964). Los anamorfos de las especies de *Botryosphaeria* se atribuyen actualmente a los géneros *Fusicoccum* Corda, *Neofusicoccum* Crous, Slippers y Everth., *Diplodia* Fr., *Lasiodiplodia* Ellis y Everth. y *Dothiorella* Sacc. (Denman *et al.*, 2000, Crous *et al.*, 2006 ; Phillips *et al.*, 2005; Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org>).

En el Capítulo I, se caracterizaron fenotípicamente y culturalmente todas las especies de *Botryosphaeriaceae* aisladas de vides enfermas confirmando la segunda hipótesis planteada y revelando que las características morfológicas son útiles para una identificación preliminar de especies, además de facilitar la identificación. A nivel mundial, se han reportado al menos 13 especies de *Botryosphaeriaceae* diferentes, mientras que, **los estudios de caracterización de colonias y estructuras reproductivas, estudio de tasas de crecimiento micelial y secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal efectuados en este trabajo de tesis, han detectado cinco de ellas: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) (*Teleom. Botryosphaeria theobromae*), *Diplodia seriata* (*Teleom. B. obtusa*), *Diplodia mutila* (*Teleom. B. stevensii*), *Fusicoccum aesculi* (*Teleom. B. dothidea*) y *Neofusicoccum luteum* (*Teleom. B. luteum*)**. En diversas regiones vitivinícolas del mundo, se han citado estas mismas especies como causantes de Black dead arm, *Botryosphaeria* canker, *Diplodia* cane dieback y decaimientos por *Neofusicoccum* (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a,b; Amponsah *et al.*, 2011; Baskarathevan *et al.*, 2012; Billones-Baaijens *et al.*, 2013; Candolfi *et al.*, 2010; Chebil *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2013; Crous *et al.*, 2001; Díaz y Latorre, 2013; Gramaje y Armengol, 2011; Larignon, 2012; Phillips *et al.*, 2002; Pitt *et al.*, 2010; Singer y Cox, 2010; Qiu *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2014; White *et al.*, 2010).

La identificación de los aislamientos obtenidos según las características morfológicas de colonias y estructuras fúngicas, constituyó un desafío, debido a la manifestación de colores y características de crecimiento similares y además, la ausencia de estructuras reproductivas sobre el medio de cultivo de varios de ellos (20 % de los aislamientos). Al respecto, Denman *et al.* (2000)

también reportaron dificultades para lograr la formación de estructuras reproductivas en medios artificiales y condiciones de laboratorio para algunas especies. **Se identificaron fehacientemente tres especies de *Botryosphaeriaceae* combinando la información de los caracteres reproductivos de los anamorfos (conidios) y de las características de la colonia: *L. theobromae*, *D. seriata* y *D. mutila*.** Si bien, la morfología de las colonias en el anverso y reverso, el margen decrecimiento y la textura de la colonia, el tamaño, forma de conidios y capacidad de esporulación de los aislamientos fueron variables, se estableció una clara concordancia entre los resultados obtenidos y la descripción de las especies.

En cultivo, la característica para el diagnóstico de *N. luteum* fue la producción de un pigmento amarillo difusible en el medio de cultivo al tercer día de cultivo. Se observaron colonias de tres días de crecimiento en APG, a 25 °C, en oscuridad, que mostraron diferencias al respecto, con otros aislamientos que no esporularon. Esto concuerda con lo publicado por Pennycook y Samuels, 1985; Phillips, 2000, 2002; Savocchia *et al.*, 2007; Slippers *et al.*, 2004b; Van Niekerk *et al.*, 2004, que establecen que ese pigmento amarillo que forma *N. luteum* lo hace distinguishable. Los aislamientos argentinos de *D. mutila* mostraron conidios hialinos mientras que *D. seriata* y *L. theobromae* se diferenciaron por la pigmentación castaña de sus conidios. La diferencia entre estas dos especies radica en que *D. seriata* posee conidios aseptados y se colorean en la madurez, mientras que *L. theobromae* posee conidios con un septo ecuatorial y son coloreados desde estadios iniciales del desarrollo, coincidente con descripciones realizadas por Luque *et al.* (2005) y Phillips *et al.* (2002, 2005). En general para los tres parámetros analizados de las estructuras reproductivas (conidios): longitud L, ancho A y relación L/A, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos de los grupos morfológicos que esporularon. Los aislamientos de *L. theobromae*, presentaron mayor ancho y longitud de conidios mientras que los aislamientos de *D. seriata* presentaron mayores valores L/A, permitiendo así la diferenciación significativa entre las especies. Los valores de longitud y ancho de conidios de *D. mutila* no permitieron la diferenciación significativa del resto de las especies, aunque presentaron significativamente una relación L/A baja.

En el presente estudio, los valores de longitud, ancho de conidios y relación L/A, resultantes para *D. mutila* (valor medio de 22,62 µm) coincidieron con las descripciones morfológicas de las especies realizadas por otros autores que establecieron que *D. mutila* posee conidios con una media menor a 24 µm de largo, entre ellos: Abdollahzadeh *et al.* (2013); Phillips *et al.*, (2002, 2006) y Taylor *et al.* (2005). Sin embargo, Pitt *et al.* (2012) especificaron valores de largo y L/A mayores a los obtenidos en el presente trabajo. Las razones de las discrepancias con los resultados obtenidos en esta tesis, son desconocidas, pero podrían reflejar diferencias entre aislamientos de la misma especie, debidas a diferencias en la ubicación geográfica de los mismos. Las particulares estriaciones longitudinales irregulares de los conidios de *L. theobromae* permitió la fácil identificación de esta especie. Asimismo, se obtuvieron valores de 25,35 µm de longitud, 14,2 µm

de ancho y 1,79 de L/A. Estos datos coinciden con lo obtenido por: Burgess *et al.* (2006); Oliveira Costa *et al.* (2006); Phillips (2002, 2004, *Botryosphaeria* site); Pitt *et al.* (2012); Rodrigues *et al.* (2011); Taylor *et al.* (2005) y Úrbez-Torres *et al.* (2008). Los valores que resultaron para *B. seriata* de longitud de conidios (22,67 μm) y valores bajos de ancho de conidios (8,60 μm), como también los valores L/A resultaron similares a los indicados por la literatura consultada: Denman *et al.* (2003); Gure *et al.* (2005); Larignon *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2005; Phillips *et al.* (2002, 2006, 2007, *Botryosphaeria* site); Pitt *et al.* (2012); Savocchia *et al.* (2007) y Úrbez-torres *et al.* (2009).

Los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* obtenidos en este estudio, resultaron patógenos, en coincidencia con los resultados generados en otros países (Amponsah *et al.* 2011; Savocchia *et al.*, 2007; Travadon *et al.*, 2013). Por lo tanto, los programas de manejo de enfermedades actualmente aplicados en viñedos argentinos, deben considerar la abundante presencia de estas especies en condiciones de campo. En las plántulas *in vitro* inoculadas con cada aislamiento, se observó menor desarrollo, presencia de hojas cloróticas, necróticas y desarrollo del hongo. Investigaciones de Úrbez-Torres y Gubler (2009), demostraron la patogenicidad de aislamientos de todas estas especies demostrando su virulencia variable: *L. theobromae* fue la especie más virulenta, seguida por *N. luteum*, *N. parvum* y *N. australe*. Posteriormente, *B. dothidea* fue considerada medianamente virulenta mientras que *D. mutila* y *D. seriata* fueron evaluadas como débilmente virulentas. Por otro lado, se demostró que las especies de este género producen sustancias fitotóxicas para las hojas de vid cultivadas en condiciones *in vitro*. *N. luteum*, *D. seriata* y *F. aesculi* producen compuestos hidrofílicos de alto peso molecular como exopolisacáridos y fitotoxinas lipofílicas de bajo peso molecular (Martos *et al.*, 2008). La presencia de inclusiones e hifas del hongo en los vasos del xilema, explicaría la restricción del flujo de agua, sales minerales y otros solutos a la planta, resultando en marchitamiento y muerte de las mismas. Se comprobó la patogenicidad de *D. seriata*, en vides cv. Red Globe, en Australia y Chile (Auger *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005). Asimismo, Van Niekerk *et al.* (2004), corroboraron que este patógeno produce lesiones en cv. Periquita, en Sudáfrica y Larignon *et al.* (2001) reportaron esta especie como responsable de un estriado oscuro en sarmientos de un año de Cabernet Sauvignon. Similares resultados obtuvieron en Australia, Castillo-Pando *et al.*, (2002) en cv. Semillon y Savocchia *et al.*, (2007) en los cvs. Chardonnay y Syrah. Por otra parte, *D. seriata* se ha asociado a problemáticas de la madera en vid en Italia (Mugnai *et al.*, 1996), Portugal (Phillips, 2002), España (Armengol *et al.*, 2001) y Francia (Larignon y Dubos, 1997).

L. theobromae, se considera un patógeno no especializado, característico de regiones tropicales y subtropicales, con una amplia distribución en plantas hospederas. Se verificó su patogenicidad en vides de México y California, cvs. Chardonnay y Thompson Seedless (Úrbez-Torres *et al.*, 2007). Por otra parte, Taylor *et al.* (2005), demostraron significativamente patogenicidad en vides cv. Red Globe, en Australia y en Italia (Burruano *et al.*, 2008). Igualmente,

se verificó la patogenicidad de *Botryosphaeria dothidea* (anamorfo de *Fusicoccum aesculi* Corda) (Armengol *et al.*, 2001) y Phillips (2000) estudió su presencia en Portugal, demostrando su patogenicidad en madera de vid. Por otra parte, Billones-Baaijens *et al.* (2013) probaron la patogenicidad de *N. luteum* en vides provenientes de vivero, consistente con reportes previos de Amponsah *et al.* (2008) y Billones-Baaijens *et al.* (2012). También, estudios de Diaz *et al.* (2013) lo citan como patógeno en vides de Chile. Investigaciones de Whitelaw-Weckert *et al.* (2006) reportaron la patogenicidad de *D. mutila* en vides de Pinot Noir en maceta y Larignon *et al.* (2001) reportaron esta especie como responsable de un estriado oscuro en sarmientos de un año de Cabernet Sauvignon. Iguales resultados obtuvieron en Australia, Castillo-Pando *et al.* (2002) y Savocchia *et al.*, (2007) en cv. Chardonnay y Syrah.

Los resultados del estudio de identificación de especies en función de su tasa de crecimiento diaria, fueron contundentes al someter los datos a un análisis estadístico factorial multivariado. Los dos factores seleccionados del análisis, explicaron el 87,33 % del total de la variabilidad. La proyección de los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* sobre el plano de los dos factores, separó claramente el total, en seis grupos de aislamientos que se correspondieron con las especies *Lasiodiplodia theobromae* (33), *Diplodia seriata* (24), *Diplodia mutila* (8), *Neofusicoccum luteum* (7), *Fusicoccum aesculi* (*Teleom. B. dothidea*) (6) respectivamente, quedando incluidos dentro de cada grupo, los patrones de referencia respectivos. El sexto grupo correspondió solo al patrón identificado de *Neofusicoccum parvum*.

La temperatura óptima para los aislamientos evaluados resultó ser de 25 °C, y su crecimiento a 10 °C fue nulo a reducido solamente en *N. luteum* y *D. mutila* que iniciaron el crecimiento de las colonias a las 48 h de incubación. Los aislamientos de *L. theobromae* y *B. obtusa* presentaron mayor superficie de la colonia en crecimiento en APG, con valores que indicaron que son hongos de crecimiento relativamente rápido, que fueron capaces de colonizar toda la caja de Petri de 85 mm de diámetro en 48 h. La mayor tasa de crecimiento de *L. theobromae* frente a otras *Botryosphaeriaceae*, ya fue descrito por Pearson y Goheen (1990). Urbez-Torres *et al.* (2006) demostraron que *N. luteum* mostró uno de los crecimientos más reducidos entre todas las especies de *Botryosphaeriaceae* estudiadas, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis que muestran las menores tasas de crecimiento en mm² día⁻¹ de 15 °C a 30 °C. Estudios de Sánchez *et al.*, 2003, ajustaron curvas de crecimiento para *B. dothidea* (*F. aesculi*) que crecieron lentamente a 10 °C y 35 °C, con temperatura óptimas de 28 °C. Sin embargo, en contraposición con los resultados obtenidos en este trabajo, otros aislamientos de *Fusicoccum* y *Neofusicoccum* obtenidos de otros huéspedes, no crecieron a 35 °C (Brooks y Ferrin, 1994, Jacobs y Rehner, 1998, Pennycook y Samuels, 1985).

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis están de acuerdo con investigaciones de Úrbez-Torres *et al.* (2006), quienes reportaron que *N. luteum* y *D. mutila* crecieron a 35 °C y Jacobs

y Rehner (1998) obtuvieron similares observaciones para *D. mutila*. Se puede inferir, entonces, que los distintos aislamientos de una misma especie difieren en sus temperaturas óptimas de crecimiento en función de su origen geográfico. A 35 °C los aislamientos de *L. theobromae* crecieron normalmente mientras que el resto creció con dificultad, en coincidencia con Carvalho Dias *et al.* (1998) que describió su crecimiento a temperaturas entre 27 °C y 35 °C. Una característica compartida por los aislamientos del tipo *F. aesculi*, *D. mutila* y *N. luteum* fue su crecimiento a 40 °C. Resultaron los tres únicos aislamientos que crecieron a la máxima temperatura ensayada. El desarrollo a altas temperaturas también fue observado por Pennycook y Samuels, (1985); Sánchez-Hernández *et al.*, (2002) y Arias, (2008). Sin embargo, este carácter no parece ser constante ya que otros autores no pudieron registrar crecimiento del hongo a 35 °C (Jacobs y Rehner, 1998). Estudios de Eng *et al.*, (2003) y Uduebo (1974), demostraron que la densidad de crecimiento de *L. theobromae* fue máxima a 30 °C. Además, Úrbez-Torres *et al.* (2006, 2009) observaron que la temperatura óptima de crecimiento para *L. theobromae* fue mayor que la de *D. seriata*, con tasas de crecimiento de 31 °C y 26 °C, respectivamente. Estos datos no coinciden con los resultados de este trabajo (25 °C), como así tampoco con lo descrito por Verma y Singh (1969). Investigaciones de Carvalho Dias *et al.* (1998) indican que la temperatura óptima de *L. theobromae* varía entre 25 °C y 33 °C, intervalo que incluye la temperatura óptima de crecimiento indicada en este trabajo para esta especie.

Para la especie *D. seriata*, Mohamandi *et al.* (2013), mostraron que aislamientos de esta especie mostraron mayores crecimientos radiales a 30 °C después de 48 h en APG, mientras que en este estudio fue a 25 °C. También contrariamente a lo obtenido, los autores observaron que especies de este género exhibieron crecimiento a 5 °C y 40 °C. Sin embargo, en coincidencia con los resultados obtenidos en esta tesis, Espinoza *et al.* (2009) y Thomidis *et al.* (2011) reportaron 25 °C como temperatura óptima para esta especie. Asimismo, Úrbez-Torres *et al.* (2006) que el máximo crecimiento radial después de 48 h fue a los 26,8 °C mientras que Ploetz *et al.* (2009) y Van Niekerk *et al.* (2004) reportaron 27 °C como temperatura óptima para *D. seriata*. Los resultados obtenidos en vid no concuerdan con Sánchez *et al.* (2003), que establecieron en *Quercus* spp., la temperatura óptima para *B. dothidea* de 28 °C. Sin embargo, si coinciden en el crecimiento a temperaturas superiores a 35 °C, en contraste con observaciones de Brooks *et al.* (1994) y Jacobs *et al.*, 1998 que no obtuvieron crecimiento a 35 °C. Luque (1989) estableció el rango óptimo de crecimiento colonial de *D. mutila*, entre 25 °C – 28 °C en APG, en el período 24 h-48 h. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio. La tasa de crecimiento máxima para *F. aesculi* que fue de 4,98 mm² día⁻¹ se obtuvo a 25 °C, en coincidencia con resultados de Brooks y Ferrin (1994) aislados de otras especies arbustivas (27 °C). Contrariamente a lo obtenido en los aislamientos argentinos de vid, Jacobs y Rehner (1998) y Moral *et al.*, (2008) describieron

aislamientos de *F. aesculi* en otros huéspedes, que no crecían a 35 °C y mostraban tasas de crecimiento bajas a 10 °C.

Existen evidencias de que diferentes especies del género, tienen diferentes temperaturas óptimas de crecimiento, las cuales podrían limitar el establecimiento de las especies en distintas regiones (Phillips, 2002; Savocchia *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006). Según Punithalingam (1976), *L. theobromae* se encuentra generalmente en regiones tropicales y subtropicales en un amplio rango de hospederos. Asimismo, Burgess *et al.* (2003) observaron que es un patógeno tropical y subtropical a nivel mundial y sus estudios establecen que el clima frío del sudoeste y oeste de Australia, podrían prevenir su establecimiento. Otro factor que afectaría la distribución de especies, es su capacidad de adaptarse a nuevos hospederos al ser introducidos en un ambiente nuevo (Slippers *et al.*, 2005).

El presente estudio permitió además, comprobar que una misma planta de vid, puede albergar distintas especies de *Botryosphaeriaceae*. También, se verificó que *L. theobromae*, *D. seriata* y *D. mutila* fueron las especies dominantes tanto en vides de < 10 años con declinamiento, como también en vides con hoja de malvón (> 10 años), obtenidos a partir de necrosis b, sectorial d, necrosis c y vasos oscurecidos. Las especies más frecuentemente aisladas en Francia han sido *D. seriata*, *N. parvum* y *D. mutila*, asociadas frecuentemente a vides con “black dead arm” (Larignon *et al.*, 2009; Laveau *et al.*, 2009). Con el paso de los años, han ido apareciendo nuevas especies de la familia *Botryosphaeriaceae* en zonas vitivinícolas argentinas, que ya han sido descritas como patógenas en vid en otras zonas a nivel mundial. En esta tesis se logró aislar *L. theobromae* de todas las provincias vitícolas argentinas, en porcentajes altos. Se destaca que los aislamientos de *D. mutila*, mostraron sus mayores porcentajes de aparición en Catamarca y luego Mendoza en las zonas Centro y Este. La especie *D. seriata* se asoció a la zona centro de Mendoza principalmente y a Catamarca. Aislamientos de *N. luteum* se encontraron en Mendoza zona centro, norte y sur y en Catamarca. La especie *F. aesculi* se detectó en mayor porcentaje en Mendoza zonas Sur y Valle de Uco y en menor proporción en la provincia de San Juan. Con estos datos obtenidos, se concluye que la intervención humana es responsable de esta distribución aleatoria, probablemente asociada a una transmisión a través de material de propagación vegetativa infectado, coincidiendo con discusiones de Slippers y Wingfield (2007) que suponen que las especies de *Botryosphaeriaceae* no se distribuyen de igual forma en los viñedos en el mundo debido a la intervención del hombre. Se puede admitir la hipótesis de que es probable que se estén introduciendo nuevas especies patógenas en nuestras zonas, procedentes de viveros de otras regiones. Por lo tanto, un muestreo más completo de todas las provincias vitivinícolas, con diferentes condiciones climáticas será necesario para resolver completamente el rol de las especies de *Botryosphaeriaceae* y su patogenicidad en vid, en nuestro país.

La identificación en base a características morfológicas no permitió una discriminación definitiva entre especies, sin embargo fue una herramienta valiosa por ser sencilla y más rápida de realizar. Fue necesario recurrir a métodos moleculares que confirmaran o no, la identificación morfológica. En la última década, se ha extendido el empleo de técnicas moleculares en la identificación y clasificación de *Botryosphaeriaceae* y la amplificación directa de secuencias de ADN ribosomal, ha tenido importantes aplicaciones para aclarar problemas taxonómicos.

En este trabajo, se realizó la extracción de ADN de los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* obtenidos de vides enfermas argentinas, se obtuvo ADN de buena calidad y en concentración suficiente para la evaluación con los ITS. Considerando el análisis estadístico, como así también las observaciones realizadas de los productos de electroforesis, se puede concluir que, al utilizar micelio de *L. theobromae* como material sobre el cual se realizó la extracción de ADN, y el empleo de los métodos de extracción propuestos por Ma *et al.*, (2002) modificado y el kit comercial Qiagen Dneasy Plant Minikit, se obtuvieron cantidades altas y de calidad de ADN que permitieron su posterior empleo en reacciones PCR y de restricción enzimática.

Se realizaron pruebas y se pusieron a punto las amplificaciones de las regiones ITS del ADN ribosómico, extendiendo el estudio a β -tubulina y NL4 obteniendo amplificaciones positivas con todas las muestras y todos los cebadores empleados. Se concluyó que los cebadores utilizados no resultaron útiles para discernir específicamente las especies sólo por técnicas de PCR, debido a que la amplificación mostró un único fragmento de 580 pb con los cebadores para ITS, mientras que el producto amplificado con los cebadores para β -tubulina y NL4, tuvieron tamaños de 450 y 1200 pares de bases respectivamente, por lo que todos los aislamientos evaluados, se agruparon en un mismo grupo. No obstante, estas regiones ha sido utilizadas por investigadores para identificar a nivel de género: *Fusicoccum*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Dothiorella*, de esta familia fúngica tanto en vid como en otras especies vegetales (Bertsch *et al.*, 2013; Denman *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004b; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Zhou y Stanosz, 2001)

La técnica molecular basada en la digestión de las amplificaciones del ADN ribosómico de ITS, con endonucleasas de restricción de corte frecuente, ofreció un patrón específico que permitió diferenciar 29 aislamientos de *Botryosphaeriaceae*. Sin embargo, estos métodos detectaron diferencias entre aislamientos de una misma especie, por lo que serían más apropiados para estudios de estructuras poblacionales y variabilidad genética, para lograr una detección rápida. Baskarathavan *et al.* (2012), confirmaron las identificaciones morfológicas de *D. mutila* y *D. seriata*, por restricción de la región ITS, utilizando *AsuI* y *NcoI*, respectivamente.

Se obtuvieron 76 aislamientos de *Botryosphaeria* spp. (teleomorfo). Se describieron morfológicamente y se identificaron cuatro especies de anamorfos: *Neofusicoccum luteum* (*B. lutea*), *Lasiodiplodia theobromae* (*B. rhodina*), *Diplodia seriata* (*B. obtusa*) y *D. mutila* (*B. stevensii*). El análisis de la secuencia ITS del ADN ribosomal de una selección representativa

de los distintos aislamientos corroboró los resultados morfológicos. Asimismo, se atribuyó identidad a los aislamientos que no esporularon y no pudieron ser identificados por sus estructuras reproductivas, para los cuales se había sugerido una designación específica. De esta manera, quedaron claramente diferenciadas *B. dothidea* y *Neofusicoccum luteum*. Se detectó una variación significativa entre secuencias de PCR de región ITS del ADN ribosomal cuando no se lograron discriminar entre las especies, con los estudios de restricción de las amplificaciones de PCR con enzimas. En futuros estudios es recomendable continuar con el análisis de secuencias de la región ITS para identificar las especies emergentes en Argentina. El análisis de secuencias de las regiones de ITS, EF- α y β -tubulina fueron utilizados por Mondello *et al.* (2013), para discriminar significativamente las especies *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme* mostrando altas homologías (98-99%). Los reportes de Linaldeddu *et al.* (2014), identificaron en vides italianas, a través del análisis de secuencias de la región ITS del ADN, a los patógenos *D. seriata* y *N. parvum* como así también, citaron por primera vez en vid a dos especies: *D. olivarum* y *D. africana* y describieron una nueva especie: *L. mediterranea*. Recientes estudios de análisis de secuencias, identificaron especies de *Botryosphaeriaceae* en vid: Mohammadi *et al.* (2013) *D. seriata* y *N. parvum* en vides de Iran, Akgul *et al.* (2014) *B. dothidea*, *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. parvum* en Turquía, según estudios de Baskarathevan *et al.* (2012) *B. dothidea*, *D. seriata*, *D. mutila*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. ribis* y *N. parvum* en Nueva Zelanda, Yan *et al.* (2013) citaron *B. dothidea*, *D. seriata*, *L. theobromae* y *N. parvum* en China, Ammad *et al.* (2014) reportaron *B. dothidea*, *D. seriata* y *N. parvum* en Algeria y estudios de Chebil *et al.* (2014) citan *B. dothidea*, *D. seriata* y *N. luteum* en vides de Tunisia. La especie *N. parvum* fue identificado por análisis de secuencias de ITS en Chile (Díaz *et al.*, 2011) y *L. theobromae* en Peru (Rodríguez-Galvez *et al.*, 2015).

En este capítulo, se demuestra que el empleo de técnicas moleculares es esencial para la detección de patógenos de madera como *Botryosphaeriaceae* spp. Se concluye que la tercer hipótesis planteada es ratificada. Los análisis moleculares, particularmente, la secuenciación, resultan ser herramientas potentes y eficientes para la identificación de las especies y son de utilidad para estudios de diversidad genética dentro del género en estudio. El material fúngico identificado en este estudio, puede ser utilizado en un futuro, como patrones de referencia para la certificación sanitaria de vides.

Por todo lo anteriormente expuesto, este capítulo de la Tesis genera nuevos conocimientos en la etiología de hongos de la familia Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de la vid en Argentina, a fin de implementar un diagnóstico rápido de estos hongos de madera en vides adultas y la posibilidad de certificar plantas de vivero libres de estos patógenos y puede ser de gran valor para el diseño de medidas de control eficientes de las enfermedades de madera.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDOLLAHZADEH J; ZARE R; PHILLIPS AJL (2013). Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. Nov. *Mycologia* 105 (1): 210-220.
- ABDOLLAHZADEH J; JAVADI A; MOHMAMMADI GOLTAPEH E; ZARE R; PHILLIPS AJL (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25: 1-10.
- ABDOLLAHZADEH J; MOHMAMMADI GOLTAPEH E; JAVADI A; SHAMS-BAKHSH M; ZARE R; PHILLIPS AJL (2009). *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the *Botryosphaeriaceae* from trees in Iran. *Persoonia* 23: 1-8.
- ABREO E; MARTÍNEZ S; BETTUCCI L; LUPO S (2013). Characterization of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 42: 241-249.
- ADESEMOYE A; ESKALEN A; FABER B; O'CONNELL N (2011). Múltiple *Botryosphaeria* species causing “*Dothiorella*” gummosis in citrus. Research Project Progress Report, *Citograph* March/April 2011: 32-34.
- ADESEMOYE AO; ESKALEN A (2011). First report of *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum australe*, and *N. parvum* causing branch canker of citrus in California. *Plant Disease* 95: 770-870.
- AGRIOS GN (1996). Fitopatología. 3. ed., Editorial Uteha, Limusa, México, pp838.
- AGUSTÍ-BRISACH C; GARCÍA-JIMENEZ J; ARMENGOL J (2014). Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control. *Phytoma* 260: 25-30.
- AGUSTÍ-BRISACH C; GRAMAJE D; ARMENGOL J; GARCÍA-JIMÉNEZ J (2013a). Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. *Viñedo* 202: 108-113.
- AGUSTÍ-BRISACH C; GRAMAJE D; GARCÍA-JIMENEZ J; ARMENGOL J (2013b). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 137: 103-112.
- AKGUL DS; SAVAS NG; ESKALEN A (2014). First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey. *Plant Disease* 98(4): 568.
- ALVES A; BARRADAS C; PHILLIPS AJL; CORREIA A (2013). Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 135: 791-804.
- ALVES A; CORREIA A; PHILLIPS AJL (2006a). Multigene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* as a distinct species. *Fungal Diversity* 23: 1-15.
- ALVES A; PHILLIPS AJL; HERIQUES I; CORREIA A (2006b). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-121.
- ALVES A; PHILLIPS AJL, HENRIQUES I; CORREIA A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters* 245: 221-229.
- 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* 598-613.
- AMMAD F; BENCHABANE M; TOUMI M; BELKACEM N; GUESMI A; AMEUR C; LECOMTE P; MERAH O (2014). Occurrence of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine dieback in Algeria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38: 865-876.

- AMPONSAH NT; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2011). Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of species of the *Botryosphaeriaceae* associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 131: 467-482.
- AMPONSAH NT, JONES EE, RIDGWAY HJ, JASPERS MV (2009). First report of *Neofusicoccum australe* (*Botryosphaeria australis*), a cause of grapevine dieback in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 6-8.
- AMPONSAH NT; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2008). Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots. *New Zealand Plant Protection* 61: 301-305.
- ANDREINI L; GUARINO L; VITI R; SCALABRELLI G (2013). Evaluation of the effect of esca disease on bud break in *Vitis vinifera* L.: Possible relationship between cultivars and rootstocks. *Vitis* 52(1): 33-40.
- ARIAS S (2008). El decaimiento de la vid. Enfermedades relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. IRTA Centre de Cabrils (Barcelona) y Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias. 234 pp.
- ARMENGOL J; VICENT A; TORNÉ L; GARCÍA-FIGUERES F; GARCÍA-JIMÉNEZ J (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S325-329.
- AROCA A; GRAMAJE D; ARMENGOL J; GARCÍA-JIMÉNEZ J; RAPOSO R (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126: 165-174.
- AROCA A; GARCÍA-FIGUERES F; BRACAMONTE L; LUQUE J; RAPOSO R (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115: 195-202.
- AUGER J, ESTERIO M, RICKE G, 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.
- BASKARATHEVAN J, JASPERS MV, JONES EE, RIDGWAY HJ (2009). Evaluation of different storage methods for rapid and cost-effective preservation of *Botryosphaeria* species. *New Zealand Plant Protection* 62: 234-237.
- BASKARATHEVAN J; JASPERS MV; JONES EE; CRUICKSHANK RH; RIDGWAY HJ (2012a). Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. *Fungal Biology* 116: 276-288.
- BASKARATHEVAN J; JASPERS MV; JONES EE; RIDGWAY HJ (2012b). Incidence and distribution of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards. *European Journal of Plant Pathology* 132: 549-560.
- BATISTA DDC; NETO FPL; BARBOSA JDS; AMORIM CC; BARBOSA MAG (2012). Resistance evaluation of 47 mango germplasm to the fungi *Fusicoccum aesculis* and *Neofusicoccum parvum*. *Revista Brasileira Fruticola* 34(3): 823-831.
- BEGOUDE BAD; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; ROUX J (2010). *Botryosphaeriaceae* associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress* 9: 101-123.
- BERTSCH C; RAMÍREZ-SUERO M; MAGNIN-ROBERT M, LARIGNON P; CHONG J; ABU-MANSOUR E; SPAGNOLO A; CLÉMENT C, FONTAINE F (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62(2): 243-265.
- BESOAIN X, TORRES C, DÍAZ GA, LATORRE BA (2013). First report of *Neofusicoccum australe* associated with *Botryosphaeria* canker of grapevine in Chile. *Plant Disease* 97(1): 143.
- BIHON W; SLIPPERS B; BURGESS T; WINGFIELD MJ; WINGFIELD BD (2010). *Diplodia scrobiculata* found in the southern hemisphere. *Forest Pathology* 41(320): 175-181.

- BILLONES-BAAIJENS R (2011). *Botryosphaeria* infections in New Zealand grapevine nurseries: Sources of inoculum and infection pathways. PhD Thesis, Lincoln University, New Zealand, 286pp.
- BILLONES-BAAIJENS R; RIDGWAY HJ; JONES EE; CRUICKSHANK RH; JASPERS MV (2012). Prevalence and distribution of *Botryosphaeriaceae* species in New Zealand grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology*. Doi: 10.1007/s10658-012-0076-4.
- BILLONES-BAAIJENS R; RIDGWAY HJ; JONES EE; JASPERS MV (2013a). Inoculum sources of *Botryosphaeriaceae* species in New Zealand grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 135: 159-174.
- BILLONES-BAAIJENS R; RIDGWAY HJ; JONES EE; CRUICKSHANK RH; JASPERS MV (2013b). Prevalence and distribution of *Botryosphaeriaceae* species in New Zealand grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 135: 175-185.
- BILLONES-BAAIJENS R; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2013c). Virulence affected by assay parameters during grapevine pathogenicity studies with *Botryosphaeriaceae* nursery isolates. *Plant Pathology* doi: 10.1111/ppa.12051.
- BONFIGLIOLI R; MC GREGOR S (2006). The *Botryosphaeria conundrum* – a New Zealand perspective. *The Australian and New Zealand Grapegrower and winemaker* 2006: 49-53.
- BROOKS FE; FERRIN DM (1994). Branch dieback of Southern California chaparral vegetation. *Phytopathology* 84: 78-83.
- BURGESS TI; BARBER PA; MOHALI S; PEGG G; DE BEER W; WINGFIELD MJ (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98: 423-435.
- BURRUANO S; MONDELLO V; CONIGLIARO G; ALFONZO A; SPAGNOLO A; MUGNAI L (2008). Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 132-136.
- CANDOLFI-ARBALLO O; VALENZUELA-SOLANO C, GUBLER WD; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ (2010). *Botryosphaeriraceae* species associated with grapevine decline in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 553-556.
- CARVALHO DIASM; CHALFOUN DE SOUZA SM; PEREIRA AF (1998). Principais doenças da videira. *Informatore Agropecuario*. Belo Horizonte 19(194): 76-84.
- CASTILLO-PANDO M; SOMERS A; GREEN CD; PRIEST M; SRISKATHADES M (2002). Fungi associated with a dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30: 59-63.
- CÉSARI R; CÉSARI M (2005) Material científico y pedagógico del curso de posgrado: Estadística Multivariada, Métodos Iconográficos de observación, información y comunicación en Investigación en Ingeniería. Postgrado Regional cooperativo en alimentos, Universidad Nacional de Cuyo, de San Juan, de La Rioja y de San Luis. <http://www.fca.uncu.edu.ar>.
- CHEBIL S; FERSI R, YAKOUB A; CHENENAOUI S, CHATTAOUI M, MELKI I; ZEMNI H; RHOUMA A; DURANTE G; ZACCHI E; MLIKI A (2013). *Plant disease* Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0530-PDN>.
- CHEN SF; PAVLIC D; ROUX J; SLIPPERS B; XIE YJ; WINGFIELD MJ; XHOU XD (2011) Characterization of *Botryosphaeriaceae* from plantation-grown Eucalyptus species in South China. *Plant Pathology* 60(4): 739-751.
- CORREIA KC; CÁMARA MPS; BARBOSA MAG; SALES R; AGUSTÍBRISACH C; GRAMAJE D; LEÓN M; GARCÍA-JIMÉNEZ J; ABAD-CAMPOS P; ARMENGOL J; MICHEREFF J (2013). Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in North-eastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2): 380-387.

- CROUS PW; KANG J-C; BRAUN U (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081-1101.
- CROUS PW; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; RHEEDER J; MARASAS WFO; PHILLIPS AJL; ALVES A; BURGESS T; BARBER P; GROENEWALD JZ (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 345-253
- CROUS PW; BRAUN U; GROENEWALD JZ (2007). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- DAMM U, CROUS PW, FOURIE PH (2007). *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99(5): 664-680.
- DE LA FUENTE, I (2009). Metabolismo de los fenilpropanoides y proteínas relacionadas con la patogénesis en el mecanismo de respuesta de uva de mesa (*Vitis vinífera* L. cv. Cardinal) a elevadas concentraciones de CO₂ y bajas temperaturas. Tesis doctorado en biología, Universidad Complutense de Madrid y Facultad de Ciencias Biológicas, 2009.
- DE WET J, WINGFIELD MJ, COUTINHO TA, WINGFIELD BD (2000). Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico, and Indonesia. *Plant Disease* 84(2): 151-156.
- DE WET J; BURGESS T; SLIPPERS B; PREISIG O; WINGFIELD BD; WINGFIELD MJ (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; PREISIG O; WINGFIELD BD; WINGFIELD MJ (2008a). Patterns of multiple virus infections in the conifer pathogenic fungi, *Diplodia pinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Journal of Phytopathology* 156: 725-731.
- DE WET J; SLIPPERS B; PREISIG O; WINGFIELD BD; WINGFIELD MJ (2008b). Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 116-126.
- DENMAN S; CROUS PW; TAYLOR JE; KANG JC; PASCOE I; WINGFIELD MJ (2000). Na 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.
- DENMAN S; CROUS PW; GROENEWALD JZ; SLIPPERS B; WINGFIELD BD; WINGFIELD MI (2003). Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 95(2): 294-307.
- DÍAZ GA; LATORRE BA (2011a). Identification of fungi associated with trunk diseases of grapevine (*Vitis vinífera*) in Chile. *Phytopathologia* (Abstract) 101: S42.
- DÍAZ GA; PREHN D; BESOAIN X; CHÁVEZ ER; LATORRE BA (2011b). *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Plant Disease* 95: 1032.
- DÍAZ GA, LATORRE BA (2013). Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection* 46: 106-112.
- ENG F; GUTIÉRREZ-ROJAS M; FAVELA-TORRES E (2003). Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* R C1. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 172-175.
- EPSTEIN L; KAUR S; VANDER GHEYNST JS (2008). *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in non-coastal California grapevines. *California Agriculture*, 62(4): 161-166.
- ESKALEN A; FABER B; BIANCHI M (2013). Spore trapping and pathogenicity of fungi in the *Botryosphaeriaceae* and *diaporthaceae* associated with avocado branch canker in California. *Plant Disease* 97: 329-332.

- ESPINOZA JG; BRICEÑO EX; CHÁVEZ ER; ÚRBEZ-TORRES JR; LATORRE BA (2009). *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant disease* 93: 1187-1194.
- FARR DF; ELLIOTT M; ROSSMAN AY; EDMONDS RL (2005). *Fusicoccum arbuti* sp. nov. causing cankers on Pacific madrone in western North America with notes on *Fusicoccum dimidiatum*, the correct name for *Scytalidium dimidiatum* and *Nattrassia mangiferae*. *Mycologia* 97(3): 730-741.
- FLOWERS J; HARTMAN J; VAILLANCOURT L (2003). Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested-polymerase chain reaction. *Phytopathology* 93: 1471-1477.
- FOURIE PH; HALLEEN F (2004). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88(11): 1241-1245.
- FUSSLER L; KOBES N; BERTRAND F; MAUMY M; GROSMAN J; SAVARY S (2008). A characterization of grapevine trunk diseases in France from the National grapevine wood diseases survey. *Phytopathology* 98: 571-579.
- GEZAHGNE A; CORTINAS MM; WINGFIELD MJ; ROUX J (2005). Characterisation of the *Coniothyrium* stem canker pathogen on *Eucalyptus camaldulensis* in Etiopia. *Australasian Plant Pathology* 34: 85-90.
- GILBERTSON RL, ROJAS MR, RUSSELL DR, MAXWELL DP (1991). Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *Journal of General Virology* 72: 2843-2848.
- GIMÉNEZ-JAIME A; AROCA A; RAPOSO R; GARCÍA-JIMÉNEZ J, ARMENGOL J (2006). Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 145: 598-602.
- GLASS NL; DONALDSON GC (1995). Development of primer set designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- GLEN M; SMITH AH; LANGRELL SRH; MOHAMMED CL (2007). Development of nested polymerase chain reaction detection of *Mycosphaeriella* spp. and its application to the study of leaf disease in *Eucalyptus* plantations. *Phytopathology* 97: 132-144.
- GOLZAR H; BURGESS TI (2011). *Neofusicoccum parvum*, a causal agent associated with cankers and decline of Norfolk Island pine in Australia. *Australasian Plant Pathology* 40: 484-489.
- GRAMAJE D; ARMENGOL J (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040-1055.
- GRAMAJE D; ARMENGOL J; SALAZAR D; LÓPEZ-CORTÉS I; GARCÍA-JIMÉNEZ J (2009). Effect of hot-water treatments above 50 °C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection* 28: 280-285.
- GUBLER WD; BAUMGARTNER K; BROWNE GT; ESKALEN A; ROONEY-LATHAM S; PETIT E; BAYRAMIAN LA (2005). Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33: 157-165.
- GURE A; SLIPPERS B; STENLID J (2005). Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Mycological Research* 109(9): 1005-1014.
- HAIR JF; ANDERSON RE; TATHAM RL (1999). Análisis multivariante, Prentice-Hall, Mexico. 400 pp.
- HAWKSWORTH DL, CROUS PW, REDHEAD SA; REYNOLDS DR; SAMSON RA (2011). The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2: 105-112.

- INDERBITZIN P, BOSTOCK RM, TROUILLAS FP, MICHAILIDES TJ (2010). A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. *Mycologia* 102(6): 1350-1368.
- ISMAIL AM; CIRVILLERI G; LOMBARD L; CROUES PW; GROENEWALD JZ; POLIZZI G (2013a). Characterisation of *Neofusicoccum* species causing mango dieback in Italy. *Journal of Plant Pathology* 95(3): 549-557.
- ISMAIL AM; CIRVILLERI G; POLIZZI G; CROUS PW; GROENEWALD JZ; LOMBARD L (2013b). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* doi 10.1007/s13313-012-0163-1.
- JACOBS KA; REHNER SA (1998). Comparison of cultural and morphological characteristics and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90(4): 601-610.
- JACOBS R (2008). Characterisation of *Botryosphaeria* species from Mango in South Africa. MSc Thesis University of Pretoria.
- JAMI F; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; GRYZENHOUT M (2012a). Greater *Botryosphaeriaceae* diversity in healthy than associated diseased *Acacia* karroo tree tissues. *Australasian Plant Pathology* 42: 421-430.
- JAMI F; SLIPPERS B; WINFIELD MJ; GRYZENHOUT M (2012b). Five new species of the *Botryosphaeriaceae* from *Acacia karroo* in South Africa. *Cryptogamie Mycologie* 33: 245-266.
- JAMI F; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; GRYZENHOUT M (2013). *Botryosphaeriaceae* species overlap on four unrelated, native South African hosts. *Fungal biology* doi: 10.1016/j.funbio.2013.11.007.
- KALITERNA J; MILICEVIC T; BENCIC D; DURALIJA B (2013). First report of *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Croatia. *Plant Disease* doi: org/10.1094/PDIS-03-13-0283-PDN.
- KIM SB; KIM CS (1990). Pathogenicity and ecology of apple rot caused by *Botryosphaeria dothidea*. The comparison to resistance against apple rots among several cultivars (in Korean). *Journal Korean Soc. Hortic. Sci.* 30: 207-214.
- KIRK PM; CANNON PF; MINTER DW; STALPERS JA (2008). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 10th ed. CAB International, 2283 pp. Wallingford, UK.
- KUNTZMANN P; VILLAUME S; LARIGNON P; BERTSCH C (2010). Esca, BDA and *Eutypiosis* foliar symptoms, trunks lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis* 49: 71-76.
- LARIGNON P; DUBOS B (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147-157.
- LARIGNON P ; FULCHIC R ; CERE L ; DUBOS B (2001a). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 336-342.
- LARIGNON P; DUBOS B (2001b). Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma* 538 : 26-29.
- LARIGNON P; FONTAINE F; FARINE S; CLÉMENT C; BERTCH C (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies* 332 : 765–783.
- LARIGNON P (2010). Dépérissement sur jeunes plantes. Des symptômes liés au champignon *Neofusicoccum parvum* déjà connu comme lié au black dead arm sur vigne adultes. *Phytoma* 635 : 44-46.
- LARIGNON P (2011). Les dépérissements liés aux *Botryosphaeriaceae*. In: Les maladies du bois de la vigne. Compte rendu des Journées nationales scientifiques Maladies du bois de la vigne. Villefranche-sur-Saône, 16-17 novembre 2010. 13-15.

- LARIGNON P; COARER M; GROSJEAN C; MORVAN G (2011). Premières observations de la verticilliose chez la vigne en France. In : Les maladies du bois de la vigne. *Compte rendu des Journées nationales scientifiques Maladies du bois de la vigne*. Villefranche-sur-Saone, 16-17 novembre 2010. 9-10.
- LARIGNON P (2012). Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes. <http://www.vignevin.com>
- LATINOVIC J ; MAZZAGLIA A ; LATINOVIC N ; IVANOVIC M ; GLEASON ML (2013). Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro. *Crop Protection* 48: 35-40.
- LATORRE BA; DÍAZ GA; REED MP (2012). Effect water activity on in vitro mycelial growth of *Neofusicoccum* spp. infecting blueberry. *Ciencia e Investigación Agraria* 39(1): 2221-228.
- LAVEAU C; LETOUZÉ A; LOUVET G; BASTIEN S; GUÉRIN-DUBRANA L (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 32-46.
- LAZZIZERA G; FRISULLO S; ALVES A; PHILLIPS JL (2008). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Pathology* 57: 948-956.
- LEBART L; MORINEAU A; PIRON D (1995). Statistique Exploratoire Multidimensionnelle. Editorial DUNOD. París. 143pp.
- LEBART L (2007). DTM. Data and Text Mining, Software Estadística Exploratoria Multidimensional para datos complejos que incluyen datos numéricos y textuales. Web: <http://ses.telecom-paristech.fr/lebart/>.
- LEE SB; TAYLOR JW (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: INNIS MA; GELFAND DH; SNINSKI IJ; WHITE TJ, eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego. California: Academic Press. P282-P287.
- LINALDEDDU BT; SCANU B; SCHIAFFINO A; SERRA S (2010). First Report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49(3): 417-420.
- LINALDEDDU BT; DEIDDA A; SCANU B; FRANCESCHINI A; SERRA S; BERRAF-TEBBAL A, BOUTITI MZ; JAMAA MLB; PHILLIPS AJL (2014). Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Argeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal diversity* doi: 10.0007/s13225-014-0301-x.
- LIU JK; PHOOKAMSAK R; DOILOM M; WIKEE S; LI YM et al. (2012). Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity* 57: 149-210.
- LUCHI N, PRATESI N, SIMI L, PAZZAGLI M, CAPRETTI P, SCLA A, SLIPPERS B, PINZANI P (2011). High-Resolution melting analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine. *Fungal Biology* 115: 715-723.
- LUQUE J; MARTOS S; PHILLIPS AJL (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. Nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97: 1111-1121.
- LYNCH SC; ESKALEN A; ZAMBINO PJ; MAYORQUIN JS; WANG DH (2013). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with coast live oak (*Quercus agrifolia*) decline in southern California. *Mycologia* 105(1): 125-140.
- LUQUE J; ELENA G; GARCIA-FIGUERES F; REYES J; BARRIOS G; LEGORBURU FJ (2014). Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20: 134-143.

- MA Z, BOEHM EWA, LUO Y, MICHAILIDES TJ (2001). Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and other hosts in California. *Phytopathology* 91: 665-672.
- MA Z, MICHAILIDES TJ (2002a). Characterization of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from pistachio and other plants host in California. *Phytopathology* 92: 519-526.
- MA Z Y MICHAILIDES TJ (2002b). A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. From pistachio and various other hosts in California. *Plant Disease* 86(5): 515-520.
- MACHADO AR; PINHO DB; OLIVEIRA SAS; PEREIRA OL (2014). New occurrences of *Botryosphaeriaceae* causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39(69): 464-470.
- MAGNIN-ROBERT M, LETOUSEY P; SPAGNOLO A; RABENOELINA F; JACQUENS L; MERCIER L; CLÉMENT C ; FONTAINE F (2011). Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology* <http://dx.doi.org/10.1071/FP111083>.
- MARINCOWITZ S; GROENEWALD JZ; WINGFIELD MJ; CROUS PW (2008). Species of *Botryosphaeriaceae* occurring on *Proteaceae*. *Persoonia* 21: 111-118.
- MARQUES MW; LIMA NB; MORAIS MA; MICHEREFF SJ; PHILLIPS AJL; CÁMARA MPS (2013). *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61: 195-208.
- MARTIN MT, COBOS R (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathology Mediterranea* 46(1): 18-25.
- MARTIN L; CUESTA MJ; MARTIN MT (2011a). A new report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. hispanicum* causing grapevine trunk disease in Castilla y León, Spain. *New Disease Reports* 23: 27.
- MARTIN MT; MARTIN L, CUESTA MJ (2011b). First report of *Neofusicoccum mediterraneum* and *N. australe* causing decay in *Vitis vinifera* in Castilla y León, Spain. *Plant Disease* 95: 876.
- MARTOS S; ANDOLFI A; LUQUE J; MUGNAI L; SURICO G; EVIDENTE A (2008). Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121: 451-461.
- MEHL JW; SLIPPERS B; ROUX J; WINGFIELD MJ (2011). *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (Kiaat) in South Africa. *Mycologia* 103: 534-553.
- MICHAILIDES TJ; PUCKETT R; MORGAN DP (2010). Pomegranate decay caused by *Pilidiella granati* in California. *Phytopathology* 100: S83.
- MOHALI S; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ (2007). Identification of *Botryosphaeriaceae* from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 103-125.
- MOHAMMADI H; BANIHASHEMI Z; GRAMAJE D; ARMENGOL J (2013). Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases en Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 137-150.
- MONDELLO V, LO PICCOLO S, CONIGLIARO G, ALFONZO A, TORTA L, BURRUANO S (2013). First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other *Botryosphaeriaceae* species associated with *Botryosphaeria* dieback of grapevine in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 52(2): 388-396.
- MORAL J; LUQUE F; TRAPERO A (2008). First report of *Diplodia seriata*, the anamorph of *Botryosphaeria obtusa*, causing fruit rot of olive in Spain. *Plant Disease* 92(2): 311,
- MORENO-SANZ P; LUCCHETTA G; ZANZOTTO A; LOUREIRO MD; SUAREZ B; ANGELINI E (2013). Fungi associated to grapevine trunk diseases in young plants in Asturias (Northern Spain). *Horticultural Science (Prague)* 40(3): 138-144.

- MORINEAU A (1994). Le Thémascope ou analyse structurelle des données d'enquête, in Grangé D and Lebart, L : Traitements statistiques des enquêtes. Dumod, Paris : 135-159.
- MUGNAI L; GRANITI A; SURICO G (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease* 83: 404-418.
- MURASHIGE T; SKOOG FA (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- MURRAY MG, THOMPSON WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19): 4321-4325.
- NETTO MSB; ASSUNCAO IP; LIMA GSA; MARQUES MW; LIMA WG; MONTEIRO JHA; BALBINO VQ; MICHEREFF SJ; PHILLIPS AJL; CÁMARA MPS (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* doi: 10.007/s13225-014-0279-4.
- OGATA T, SANO T, HARADA Y (2000). *Botryosphaeria* spp. isolated from Apple and several deciduous fruit trees are divided into three groups based on the production of warts on twigs, size of conidia, and nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Mycoscience* 41: 331-337.
- OLIVEIRA COSTA VS; MICHEREFF SJ; MARTINS RB; GAVA CAT; MIZUBUTI ESG; CAMARA MPS (2010). Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 127: 509-519.
- PAVLIC D, SLIPPERS B; COUTINHO TA; GRYZENHOUT M; WINGFIELD MJ (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50: 313-322.
- PAVLIC D, SLIPPERS B; COUTINHO TA; WINGFIELD MJ (2007). *Botryosphaeriaceae* occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology* doi: 10.1111/j.1365.3059.2007.01608.x.
- PAVLIC D, WINGFIELD MJ; BARBER P; SLIPPERS B; HARDY G; BURGESS TI (2008). Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia* 100(6): 851-866.
- PAVLIC D; SLIPPERS B; COUTINHO TA; WINGFIELD MJ (2009a). Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. *Mycologia* 101(5): 000-000 doi: 103852/08-193.
- PAVLIC D, SLIPPERS B; COUTINHO TA; WINGFIELD MJ (2009b). Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the *Botryosphaeriaceae*: a case study on the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 259-258.
- PEARSON RC; GOHEEN AC (1990). Compendium of grape diseases. APS Press. Minesota, Estados Unidos. 93 pp.
- PENNYCOOK SR; SAMUELS GJ (1985). *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24: 445-458.
- PÉREZ CA; WINGFIELD MJ; SLIPPERS B; ALTIER NA; BLANCHETTE RA (2009). *Neofusicoccum eucalyptorum*, a *Eucalyptus* pathogen, on native *Myrtaceae* in Uruguay. *Plant Pathology* 58: 964-970.
- PÉREZ CA, WINGFIELD MJ; SLIPPERS B, ALTIER NA; BLANCHETTE RA (2010). Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41: 53-69.
- PHILLIPS AJL (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoiiose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146: 327-332.
- PHILLIPS AJL (2000). *Botryosphaeria populi* sp. Nov. and ITS *Fusicoccum* anamorph from poplar trees in Portugal. *Mycotaxon* LXXVI: 135-140.

- PHILLIPS AJL (2002a). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41(1): 3-18.
- PHILLIPS AJL; FONSECA F; POVOA V; CASTILHO R; NOLASCO C (2002b). A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54: 59-77.
- PHILLIPS AJL, RUMBOS IC, ALVES A, CORREIA A (2005a). Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia* 159: 433-439.
- PHILLIPS AJL; ALVES A; CORREIA A; LUQUE J (2005b). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella anamorphs*. *Mycologia* 97: 513-529.
- PHILLIPS AJL; OUDEMANS PV; CORREIA A; ALVES A (2006). Characterisation and epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. *Fungal Diversity* 21: 141-155.
- PHILLIPS AJL; CROUS PW; ALVES A (2007). *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity* 25: 141-155.
- PHILLIPS AJL; ALVES A; PENNYCOOK SR; HOHNSTON PR; RAMALEY A; AKULOV A; CROUS PW (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21: 29-55.
- PHILLIPS AJL; LOPES J; ABDOLLAHZADEH J; BOBEV S; ALVES A (2012). Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia* 29: 29-38.
- PHILLIPS AJL; ALVES A, ABDOLLAHZADEH J; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; GROENEWALD JZ; CROUS PW (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.
- PISKUR B; PAVLIC D; SLIPPERS B; OGRIS N; MARESI G; WINGFIELD MJ; JURCD (2011). Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. *European Journal of Forest Research* 130: 235-249.
- PITT WM; HUANG R; TROUILLAS FP; SAVOCCHIA S; STEEL CC (2010). Evidence that *Eutypa lata* and other diatrypaceous species occur in New South Wales vineyards. *Australasian Plant Pathology* 39: 97-106.
- PITT WM; SOSNOWSKI MR; HUANG R; QIU Y; STEEL CC; SAVOCCHIA S (2012). Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease* 96: 1303-1308.
- PITT WM; ÚRBEZ-TORRES JR; TROUILLAS FP (2013a). *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spercermartinsia*. *Fungal Diversity* doi 10-1007/s13225-013-0244-7.
- PITT WM; TROUILLAS FP; GUBLER WD; SAVOCCHIA S; SOSNOWSKI MR (2013b). Pathogenicity of diatrypaceous fungi on grapevines in Australia. *Plant Disease* 97: 749-756.
- PLOETZ RC; PÉREZ-MARTÍNEZ JM; PALMATEER AJ; TARNOWSKI TL (2009). Influence of Temperature, light intensity, and isolate on the development of *Neofusicoccum parvum*-induced Dieback of Eugenia, *Syzygium paniculatum*. *Plant Disease* 93(8): 804-808.
- PUNITHALINGAM E; WALKER JM (1973). *Botryosphaeria obtusa*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, no 394. Commonwealth Mycological institute, Kew, Surrey, England.
- QIU Y, STEEL CC, ASH GJ, SAVOCCHIA S (2011). Survey of *Botryosphaeriaceae* associated with grapevine decline in the Hunter Valley and Mudgee grape growing regions of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 40: 1-11.
- RAEDER U, BRODA P (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20.

- RODRIGUES KF; SIEBER TN; GRUNING CR; HOLDENRIEDER O (2004). Characterization of *Guignarida mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSC-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycological Research* 108: 45-52.
- RODRIGUEZ-GALVEZ E; MALDONADO E; ALVES A (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology* 141(3): 477-489.
- ROGERS SO; REHNER SA; BLEDSOE C; MUELLER GJ; AMMIRATI JF (1989). Extraction of DNA from basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations. *Canadian Journal of Botany* 67: 1235.
- ROHLF FJ (1993). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Applied Estadistics Inc., Setauket, New York.
- ROLSHAUSEN PE; ÚRBEZ-TORRES JR; ROONEY-LATHAM S; ESKALEN A; SMITH RJ; GUBLER WD (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 113-119.
- ROLSHAUSEN P; KIYOMOTO R (2011). The status of grapevine trunk diseases in the Northeastern United States. Doi: [http:// www.newenglandvfc.org/pdf_proceedings/status_grapevinetrunkdisease](http://www.newenglandvfc.org/pdf_proceedings/status_grapevinetrunkdisease).
- SAKALIDIS ML; HARDI G; BURGESS TI (2011a). Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Ecology* 4, 1-14.
- SAKALIDIS ML; RAY JD; LASNOISELET V; HARDY G; BURGESS T (2011b). Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130, 379-391.
- SAKALIDIS ML; HARDY G; BURGESS TI (2011c). Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*- *N. ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60, 333-344.
- SAKALIDIS ML; HARDY G, BURGESS TI (2011d). Class III endophytes, clandestine movement amongst hosts and habitats and their potential for disease; a focus on *Neofusicoccum australe*. *Australasian Plant Pathology* 40, 510-521.
- SAKALIDIS ML; SLIPPERS B; WINGFIELD BD; HARDY GSJ; BURGESS TI (2013). The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions. Global populations of the *Neofusicoccum parvum* – *N. ribis* species complex. *Diversity and Distributions* doi: 10.1111/ddi.12030.
- SAMMONDS J; BILLONES R; ROCCHETTI M; RIDGWAY HJ; WALTER M; JASPERS MV (2009). Survey of blueberry farm for *Botryosphaeria* dieback and crown rot pathogens. *New Zealand Plant Protection* 62: 238-242.
- SAVOCCHIA S; STEEL CC; STODART BJ; SOMERS A (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46: 27-32.
- SCHOCH CL; SHOEMAKER RA; SEIFERT KA; HAMBLETON S; SPATAFORA JW; CROUS PW (2006) A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041-1052.
- SCHOCH CL (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 109: 6241-6246.
- SHAH MD, VERMA KS, SINGH K, KAUR R (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (*Botryosphaeriaceae*) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research* 9(2): 1217-1228.
- SHOEMAKER RA (1964): Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42: 1297-1301.

- SINGER SD; COX KD (2010). The Reemergence and Management of currant cane dieback in the Northeastern United States. *Plant Disease* 94(119): 1283-1289.
- SLIPPERS B; BURGESS T; WINGFIELD BD, CROUS PW; COUTINHO TA; WINGFIELD MJ (2004a). Development of simple sequence repeat markers for *Botryosphaeria* spp. With *Fusicoccum* anamorphs. *Molecular Ecology Notes* 4: 675-677.
- SLIPPERS B; CROUS PW; DENMAN S; COUTINHO TA; WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ (2004b). Combined multiple genes genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*. 96(1): 83-101.
- SLIPPERS B; FOURIE B; CROUS PW; COUTINHO TA; WINGFIELD BD; WINGFIELD MJ (2004c). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycol.* 96(5): 1030-1041.
- SLIPPERS B; FOURIE G; CROUS PW; COUTINHO TA; WINGFIELD BD; CARNEGIE j; WINGFIELD MJ (2004d). Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. On native and introduced Eucalyptus trees in Australia and South Africa. *Stud. Mycol.* 50: 343-358.
- SLIPPERS B, SUMERELL BA, CROUS PW, COUTINHO TA, WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ (2005a). Preliminary studies on *Botryosphaeria* species from Southern Hemisphere conifers in Australasia and South Africa. *Australasian Plant Pathology* 34: 213-220.
- SLIPPERS B, STENLID J, WINGFIELD MJ (2005b). Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 420-421.
- SLIPPERS B, Y WINGFIELD MJ (2007a). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21(2-3): 90-106.
- SLIPPERS B, SMIT WA, CROUS PW, COUTINHO TA, WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ (2007b). 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(1): 128-139.
- SLIPPERS B; ROUX J; WINGFIELD MJ; WALT FJJ; JAMI F; MEHL JWM; MARAIS GJ (2014). Confronting the constraints of morphological taxonomy in the fungi: A *Botryosphaeriaceae* case study. *Persoonia*: in press.
- SMITH H; WINGFIELD MJ; PETRINI O (1995). *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management* 89: 189-195.
- SMITH DR; STANOSZ GR (2001). Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorphs *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia* 93: 505-515.
- SMITH DR Y STANOSZ GR (2006). A species-specific PCR Assay for Detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in Dead Red and Jack Pines with Collar Rot Symptoms. *Plant Disease* 90(3): 307-313.
- SNEATH PHE; SOKAL RR (1973). Principles of Numerical Taxonomy. Freeman & Co. San Francisco.
- SOKAL RR; MICHENER CD (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin* 38: 1409-1438.
- SPAGNOLO AG; MARCHI G, PEDUTO F; PHILLIPS AJL; SURICO G (2014). Detection of *Botryosphaeriaceae* species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/ *N. ribis* complex. *European Journal of Plant Pathology* 34: 187-195.
- STANOSZ GR, SWART WJ, SMITH DR (1998). Similarity between fungi identified as *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* in Israel and *Botryosphaeria stevensii* or *Diplodia mutila* on *Juniperus* in the United States. *European Journal of forest Pathology* 28: 33-42.
- STANOSZ GR; BLODGETT JT; SMITH DR; KRUGER EL (2001). Water stress and *Spaheropsis sapinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings. *Forestry pathology* 37: 531-538.

- SURICO G, MUGNAI L; MARCHI G (2006). Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S68-S86.
- SWART WJ, WINFIELD MJ, KNOX-DAVIES J (1987). Selective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* 77: 1387-1389.
- TAYLOR A; HARDY GE; WOOD P; BURGESS T (2005). Identification and pathogenesis of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34: 187-195.
- TAYLOR A, BARBER PA; HARDY G; BURGESS TI (2009). *Botryosphaeriaceae* from tuart (*Eucalyptus gomphocephala*) woodland, including descriptions of four new species. *Mycological Research* 113: 337-353.
- THOMIDIS T, MICHAELIDES TJ, EXADAKTYLOU E (2011). *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131: 661-668.
- TOVAR-PEDRAZA JM; MORA-AGUILERA JA; NAVA-DÍAZ C; TELIZ-ORTIZ D; VALDOVINOS-PONCE G; VILLEGAS-MONTER A; HERNÁNDEZ-MORALES J (2012). Identification, pathogenicity, and histopathology of *Lasiodiplodia theobromae* on mamey sapote grafts in Guerrero, Mexico. *Agrociencia* 46: 147-161.
- TRAVADON R, ROLSHAUSEN PE, GUBLER WD, CADLE-DAVIDSON L; BAUMGARTENER K (2013). Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease* 97(12): 1529-1536.
- TROUILLAS FP; PITT WM; SOSNOWSKI MR; HUANG R, PEDUTO F; LOSCHIAVO A.; SAVOCCHIA S; SCOTT ES; GUBLER WD (2011). Taxonomy and DNA phylogeny of *Diatrypaceae* associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity* 49(1): 203-223.
- TWIZEYIMANA M; FORSTER H; MCDONALD V; WANG DH; ADASKAVEG JE; ESKALEN A (2013). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease* 97: 1580-1584.
- UDUEBO A (1974). Effect of high temperature on the growth, sporulation, and pigment production of *Botryodiplodia theobromae*. *Canadian Journal of Botany* 52(12): 2631-2634.
- ÚRBEZ-TORRES JR; PELÁEZ JR; SANTIAGO Y; MARTIN C, MORENO C; GUBLER WD (2006a). Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea* and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Disease* 90: 835.
- ÚRBEZ-TORRES JR; LEAVITT GM; NOEGEL T; GUBLER WD (2006b). Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevines cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490-1503.
- URBEZ-TORRES JR, LEAVITT GM, GUERRERO JC, GUEVARA J, STRIEGLER K, ALLEN A, GUBLER WD (2007). Identification of fungal pathogens associated with grapevine cankers in the main grape-growing areas of the United States and Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 109-110.
- ÚRBEZ-TORRES JR, GUBLER WD (2009). Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93(6): 584-592.
- ÚRBEZ-TORRES JR, ADAMS P; KAMAS J; GUBLER WD (2009). Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enologie and Viticulture* 60: 497-507.
- ÚRBEZ-TORRES JR; HAAG P, BOWEN P; O'GORMAN DT (2014). Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. *Plant Disease* 98: 469-482.

- VAN NIEKERK JM; CROUS PW; GROENEWALD JZ; FOURIE PH; HALLEEN F (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.
- VAN NIEKERK JM; FOURIE PH; HALLEEN F; CROUS PW (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S43-S54.
- VAN NIEKERK JM; BESTER W; HALLEENF; CROUS PW (2010). First report of *Lasiodiplodia crassispora* as a pathogen of grapevine trunks in South Africa. *Plant Disease* 94: 1063.
- VERMA OP; SINGH RD (1969). Epidemiology of mango dieback caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Indian Journal of Agricultural Science* 40: 813-818.
- VON ARX JA (1987). Plant pathogenic fungi, J. Cramer, Berlin (87): 288.
- WHITE TJ; BRUNS T; LEE S; TAYLOR JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp 315-322. In. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds INNIS, MA; GELFAND DH; SNINSKY JJ; WHITE TJ. Academic Press, Inc., New York.
- WHITE CL; HALLEEN F; FISCHER M; MOSTERT L (2010). Characterisation of the fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 204-223.
- WHITELAW-WECKERT MA; RAHMAN L; APPLEBY LM; HALL A; CLARK AC; HARDIE WJ; WAITE HL (2013). Co-infection by *Botryosphaeriaceae* and *Ilyonectria* spp. funi during propagation causes decline of young grafted grapevines. *Plant Pathology* 62:1226-1237.
- WHITELAW-WECKERT MA; SERGEEVA V; PRIEST MJ (2006). *Botryosphaeria stevensii* infection of Pinot noir grapevines by soil-root transmission. *Australasian Plant Pathology* 35(3): 369-371.
- WINFGFIELD MJ; WILHELM DE BEER Z; SLIPPERS B; WINGFIELD B; GROENEWALD JZ; LOMBARD L; CROUS P (2012). One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(6): 604-613.
- WUNDERLICH N; SOUSA COSTA S, TPOI RP; AS GJ (2012). First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight and cankers of pistachio in Australia. *Australasian Plant Diseases Notes*. 7: 47-49.
- WUNDERLICH N; ASH GJ; STEEL CDC; RAMAN H; COWLING A; SAVOCCHIA S (2011). Refining the biological factors affecting virulence of *Botryosphaeriaceae* on grapevines. *Annals of Applied Biology* 159: 467-477.
- YAN JY; XIE Y; ZHANG Y; LIU JK; HYDE KD, SEEM RC; ZHANG GZ; WANG ZY; YAO SW; BAI XJ; DISSANAYADE AJ; PENG YL; LI XH. (2013). Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China. *Fungal diversity* 61: 221-236.
- ZANZOTTO A; GARDIMAN M; LOVAT L (2008). Effect of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on in vitro grapevine plants. *Scientia Horticulturae* 116: 404-408.
- ZHOU S; SMITH DR; STANOSZ GR (2001). Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 5: 919.926.
- ZHOU S; STANOSZ GR (2001). Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. *Mycological Research* 105(9): 1033-1044.

CAPÍTULO III.

Estudios de tolerancia de Vitis spp. frente al hongo Lasiodiplodia theobromae



3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Los compuestos fenólicos en las plantas

Recientemente, se ha observado la existencia de cultivares de vid más y menos tolerantes a las enfermedades de madera, y la principal hipótesis planteada sobre este comportamiento, se basa en el incremento de compuestos antimicrobianos constitutivos e inducidos en los tejidos de plantas tolerantes (fitoalexinas). Como consecuencia de ello, tanto el aumento de la producción endógena como la aplicación exógena de éstos compuestos, podrían ser empleados para reducir enfermedades en vid (Delaunoy *et al.*, 2013; Jeandet *et al.*, 2013; Kiselev *et al.*, 2011). En la vid, las principales fitoalexinas son de naturaleza fenólica. Su rol en la resistencia de especies leñosas a podredumbres de madera, ha sido ampliamente estudiado y su implicancia en la tolerancia de la vid a hongos de madera es motivo de esta tesis.

Los compuestos fenólicos constituyen un conjunto heterogéneo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos, poseen en su estructura, uno o más anillos aromáticos (grupos bencénicos, C₆-OH) con al menos, un sustituyente hidroxilo y pueden encontrarse en la naturaleza en formas conjugadas formando de distintos derivados (glicósidos, ésteres, metil éteres, etc.) (Romero de la Fuente, 2009; Lopez da silva, 2004).

Probablemente, su actividad biológica más investigada, es su poder antioxidante, debido a la reactividad del grupo fenol de su estructura, y por lo tanto, su capacidad de detoxificar radicales libres producidos en condiciones patogénicas, actividad que minimiza los daños a macromoléculas (lipidos, proteínas, DNA) y estructuras celulares (Vitalini, 2012). Además, participan en diversas funciones de estructura y defensa vegetal, como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de pigmentos, señalización en alelopatías y simbiosis.

Se conocen compuestos de este tipo que participan en la atracción de polinizadores y fundamentalmente, son fitoalexinas implicadas en respuestas de defensa frente al ataque de patógenos y a factores estresantes (radiaciones UV, altas temperaturas, heridas, carencias minerales). También, se los asocia al color, características sensoriales y nutritivas y propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Dani *et al.*, 2010; Lambert, 2012, Romero de la Fuente, 2009).

Las fitoalexinas de la familia *Vitaceae*, son sujeto de numerosos estudios a causa de sus implicancias en la fitopatología y asimismo, por su efecto beneficioso para la salud humana y aplicaciones en la industria farmacológica. Diversos estudios experimentales y epidemiológicos demuestran la acción de estilbenos como el resveratrol, en la prevención del cáncer, de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas y su acción sobre la diabetes.

Asimismo, corroboran sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antimutagénicas, antihipertensivas, antiinflamatorias, y analgésicas (Aggarwal *et al.*, 2004; Caruso *et al.*, 2004; Dixon y Pasinetti, 2010; Farghali *et al.*, 2013; Fremont, 2000; Guilford y Pezzuto, 2011; Iriti y Faoro, 2009; Iriti y Vitalini 2011; Jang *et al.*, 1997; King *et al.*, 2006; Kiselev, 2011; Lambert, 2012; Pawlus *et al.*, 2012; Pezzuto, 2011; Piotrowska *et al.*, 2012; Rayne *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2002, 2007; Wang *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2010; Zhang, 2003).

Por otro lado, los compuestos fenólicos sintetizados en las bayas de la vid en respuesta a una infección de un patógeno o a un estrés abiótico, sufren una transformación durante la fermentación, de modo que determina las características del vino, principal producto derivado de la vid (Buiarelli *et al.*, 2007; Boutegrabet *et al.*, 2011; Bustos *et al.*, 2012; Deloire *et al.*, 1998; Fanzone *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2011; Naugler *et al.*, 2007; Nour *et al.*, 2012; Stervbo *et al.*, 2007; Vitrac *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2012).

3.1.2. Biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas

Se conocen dos rutas metabólicas por las cuales se forman los compuestos fenólicos: por un lado, la vía de los Policétidos, minoritaria en plantas superiores, a partir de Acetil CoenzimaA a la que se le van adicionando unidades de malonil-CoA; por otro lado, son sintetizados a partir de la fenilalanina, a través del metabolismo fenilpropanoide (Dixon y Paiva, 1995) mayoritario en las plantas superiores. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de compuestos complejos (Ali *et al.*, 2010; Boubakri *et al.*, 2013; Chong *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2008; Jeandet *et al.*, 2010; Lambert, 2012). La ruta fenilpropanoide involucra reacciones complejas, cuyo punto inicial es el final de la vía del ácido shiquímico que surge de la condensación de la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvatoA y posteriores modificaciones. Se simplifica la vía biosintética de los compuestos fenólicos en la Figura 3.1.

La primera enzima involucrada en esta vía es la fenilalanina amonioliasa (PAL) que cataliza la desaminación del aminoácido fenilalanina para formar el ácido cinámico, precursor de los ácidos benzoicos. Posteriormente, la cinamato-4-hidroxilasa convierte el ácido cinámico en ácido p-cumárico, precursor de los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico y sinapínico) a partir de los cuales derivan las ligninas a través de la enzima cinamoil-CoA reductasa (CCR). Los ácidos benzoicos e hidroxicinámicos originan los denominados ácidos fenólicos. El p-cumarato forma la p-cumaroil-CoA por la 4-cumaroil-CoA ligasa. El producto de condensación de p-cumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA constituye el sustrato de dos enzimas: la chalcona sintasa (CHS) involucrada en la biosíntesis de flavonoides (C6-C3-C6) (flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianos y 3-deoxiantocianidinas) y la estilbeno sintasa (STS) que cataliza la biosíntesis de resveratrol, precursor de los estilbenos (C6-C2-C6).

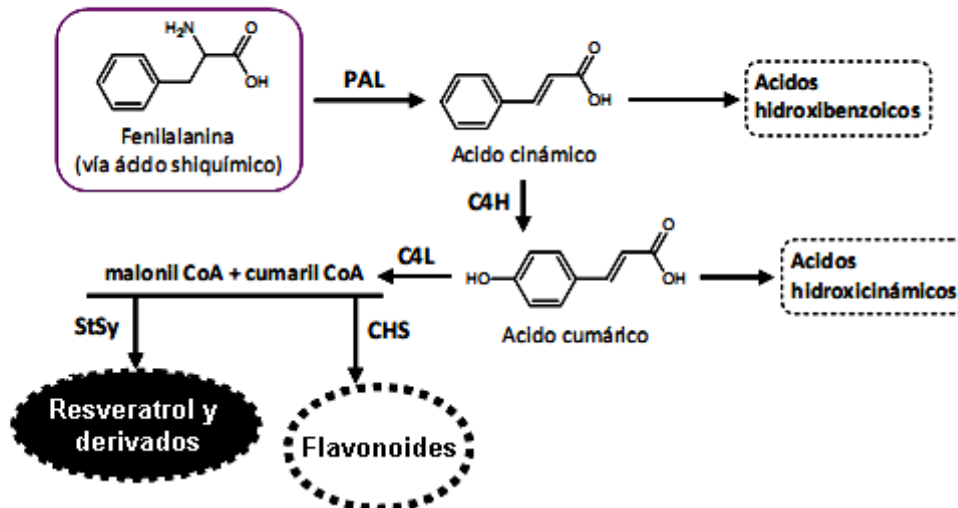


Figura 3.1. Vía de síntesis simplificada de fenilpropanoides (Fanzone, 2012). C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa; CHS: chalcona sintasa; PAL: fenilalanina amonioliasa; STS: estilbeno sintasa.

El metabolismo de los compuestos fenólicos y sus regulaciones son complejos y no todos los mecanismos han sido dilucidados por completo. La actividad de la PAL, aumenta cuando la vid es sometida a situaciones de estrés hídrico, biótico, radiaciones UV o bajas temperaturas (Faulin, 2010; Romero de la fuente, 2009). Igualmente, la STS también puede ser inducida por factores abióticos como radiaciones UV, ozono o estreses bióticos, constituyendo un biomarcador de defensa importante (Adrian *et al.*, 2000). La acumulación coordinada de ambos mensajeros sugiere que las respuestas podrían ser reguladas a través de un mecanismo de control común. Además, se considera que éstas enzimas están reguladas por el SA y MeJA, moléculas implicadas en sistemas de señalización (Lambert, 2012). Múltiples investigadores describen la acumulación de mRNAs de PAL, STS y CHS en respuesta a diferentes estreses (Ferri *et al.*, 2011; Leyva *et al.*, 1995; Versari *et al.*, 2001). Particularmente, se ha estudiado un incremento en la expresión de genes relacionados con la STS y la PAL en respuesta a la inoculación con *B. cinerea* y *P. vitícola* (Chong *et al.*, 2009; Romero de la Fuente, 2009).

3.1.3. Compuestos fenólicos detectados en vid

Pueden diferenciarse dos grandes categorías de compuestos fenólicos en vid: los no flavonoides (ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, taninos y estilbenos) y los flavonoides (antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanones, flavonoles y flavanoles).

Los **flavonoides** difundidos en vid son las antocianinas malvidina, peonidina, delphinidina, petunidina y cianidina (Cai *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2010) a los que se les adjudica una actividad fotoprotectora (Agati *et al.*, 2013). También se han identificado flavonoles como el kaempferol, la quercetina y la myricetina; flavonas, como la apigenina y la luteolina y los

flavanoles catequina, epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y proantocianidinas (taninos). A éstos compuestos, también se les atribuye el rol de protección contra UV y antioxidantes (Becker *et al.*, 2013; Obreque-Slier *et al.*, 2012). Trabajos recientes sugieren que los flavonoides contribuyen a la resistencia de ciertos cultivares a *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola* (Below, 2012; Guerrero *et al.*, 2010; Ignat *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012).

Las fitoalexinas más relevantes en vid, corresponden al grupo de **no flavonoides**, con estructura C6-C2-C6, dos ciclos bencénicos unidos por dos carbonos unidos entre ellos por doble ligadura. Se han identificado aproximadamente 100 estilbenos en *Vitis*. El primer estilbeno identificado en las *Vitáceas*, unidad molecular fundamental y más extendida, es el **trans-resveratrol** (trans-3,4',5-trihydroxystilbene), cuya estructura química consiste en dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace de estireno. Debido a ese doble enlace, puede ser transformado en el isómero *cis*-resveratrol, menos estable a causa de un efecto estérico (de orientación) entre anillos aromáticos (Ahuja *et al.*, 2012; Babikova *et al.*, 2008; Borie *et al.*, 2004; Cetin *et al.*, 2011; Chong *et al.*, 2009; Commun *et al.*, 2003; Dubrovina *et al.*, 2009; Gindro *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2014; Latouche *et al.*, 2013; Macke *et al.*, 2012; Pawlus *et al.*, 2012; Schnee *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2013; Vergara *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011).

Los estilbenos son producidos por estilbenos sintetas (STSS) a partir del *p*-cumaroil-CoA o análogos estructurales. Posteriormente sufren transformaciones como isomerización, metilación, glicosilación y oligomerización, como muestra la Figura 3.2 (Bellow, 2012; Danielsson *et al.*, 2011). La unidad básica sufre transformación para proteger la célula vegetal de sus potenciales efectos tóxicos y asimismo, los preserva de oxidación y degradación enzimáticas, mejorando su estabilidad. La glicosilación, podría estar involucrada en el almacenamiento, transporte desde citoplasma a apoplasto por ser solubles en agua y protección de la degradación peroxidativa (Lambert, 2012).

La Figura 3.2 sintetiza los principales derivados del resveratrol que comúnmente se encuentran en la vid. Se citan, los derivados glicosidados, ***cis*- y *trans*-piceidos** (Anastasiadi *et al.*, 2012; Buiarelli *et al.*, 2007; Ha *et al.*, 2009b; Jiang *et al.*, 2012; Leblanc *et al.*, 2008; Naugler *et al.*, 2007; Santamaria *et al.*, 2011); su derivado dimetilado **pterostilbene** (Adrian *et al.*, 2000; Gamm *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2011; Schmidlin *et al.*, 2008; Vrhovsek *et al.*, 2012) y oligómeros del resveratrol denominados **α -viniferina, β -viniferina, δ -viniferina** (Amico *et al.*, 2009; Bisson *et al.*, 2011; Jean-Denis *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2011; Macke *et al.*, 2012; Zga *et al.*, 2009) y **Vitisina A** (Bindon *et al.*, 2011; Chiou *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2012; Mattivi *et al.*, 2011). Paralelamente, se han identificado otros estilbenos con actividades biológicas promisorias como **piceatanol** o astringinina (Bavaresco *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Waffo-Teguo *et al.*, 1998; Zga *et al.*, 2009), **scirpusina A** (Kong *et al.*, 2010), **vaticanol C** (Mattivi *et al.*, 2011) y **ampelopsina** (Chiou *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009b; Mattivi *et al.*, 2011).

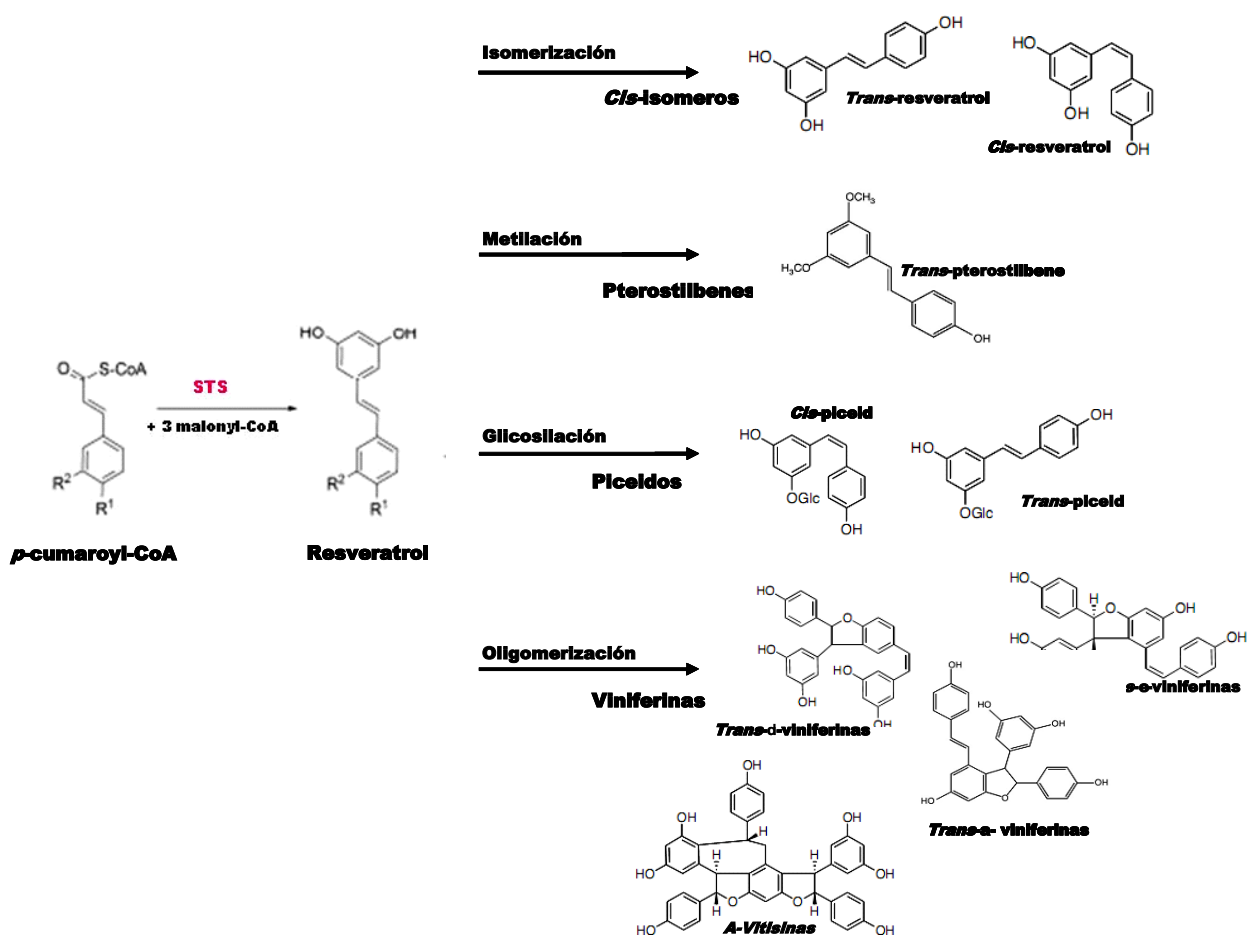


Figura 3.2. Formación de los estilbenos a través de la STS y ejemplos de transformaciones comunes que sufren estos compuestos.

Numerosas investigaciones involucran a los estilbenos con los mecanismos de defensa de la vida y su poder antimicrobiano y hoy en día, está bien documentado (Parage *et al.*, 2012).

Se acumula en respuesta a infecciones de *Plasmopara vitícola* (Agati *et al.*, 2008; Alonso Villaverde *et al.*, 2011; Bellow *et al.*, 2013; Boubakri *et al.*, 2013; Dufour y Corio-Costet, 2013; Gindro *et al.*, 2012; Godart *et al.*, 2009; Goncalvez *et al.*, 2011; Malacarne *et al.*, 2011; Mattivi *et al.*, 2011; Latouche *et al.*, 2013; Steimez *et al.*, 2012; Triska *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012); *Erysiphe necator* (Dai *et al.*, 2012; Pezet *et al.*, 2004a,b; Romero-Pérez *et al.*, 2001; Shiraishi *et al.*, 2010); *Botrytis cinerea* (Adrian y Jeandet, 2012; Favaron *et al.*, 2009; Jeandet *et al.*, 2010; Timperio *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2011); **hongos de madera de la vid** (Almafitano *et al.*, 2011; Del Río *et al.*, 2001, 2004; Martin *et al.*, 2009; Morrisey y Osbourn, 1999; Lima *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2013; Schimidlin *et al.*, 2008; Travadon *et al.*, 2013; Rotter *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2006); **virus y bacterias** (Gutha *et al.*, 2010; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Sguerri *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013); **insectos** (Cai *et al.*, 2012); **radiación UV y heridas** (Bavaresco *et al.*, 2009; Shiraishi *et al.*, 2010; Keskin y Kunter, 2008; Koyama *et al.*, 2012; Lijavetzky *et al.*, 2008; Majer e Hideg, 2012;

Wang *et al.*, 2010) y **sustancias químicas elicitoras** (AJ, ciclodextrinas y Na-ortho-vanadato, cloruro de aluminio, utilizados individualmente o en combinación) (Belchí-Navarro *et al.*, 2011, 2013a,b; Belhadj *et al.*, 2008; Boubakri *et al.*, 2012, 2013; Bejan y Visoiu, 2011; Donnes *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2010; Godart *et al.*, 2009; Kiselev *et al.*, 2011; Lopez y Carmona, 2008; Pastor *et al.*, 2013; Poutaraud *et al.*, 2011; Riedel *et al.*, 2012, Santamaria *et al.*, 2010, 2011; Tassoni *et al.*, 2012).

Existen evidencias del carácter fitoalexínico del resveratrol: su elicitación y rápida acumulación tras la infección del patógeno y la detención de actividad de microorganismos patógenos observada en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, se ha comprobado que su carácter antifúngico no es específico para un microorganismo, sino que se produce en la vid frente a numerosos factores bióticos y abióticos. A pesar de la importancia de las enfermedades de madera de la vid y sin un fungicida eficaz para su control, hay pocos estudios que comparen la susceptibilidad de diferentes cultivares de vid por lo que es fundamental realizar una selección previa de cultivares que ofrezcan cierta tolerancia, entonces, la determinación del resveratrol como respuesta antifúngica constituye una herramienta idónea para ser utilizada como indicador de tolerancia.

3.1.4. Métodos utilizados en la cuantificación de estilbenos

La bibliografía confirma el uso predominante de la Cromatografía de Líquidos (LC), Cromatografía de Gases (GC) y Electroforesis Capilar (EC) para analizar y cuantificar por separación cromatográfica, el resveratrol.

Los primeros estudios realizados para la determinación de *trans*-resveratrol utilizan la **Cromatografía de Gases (GC)**. Sin embargo, los procesos de extracción y derivación requieren mucho tiempo y provocan la isomerización del *trans*-resveratrol en *cis*-resveratrol (Montero, 2003; Cai *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2014).

La **Cromatografía de líquidos** incluye las técnicas más populares y fiables de separación de estilbenos, en base a su polaridad. En estas técnicas desarrolladas a principios del siglo XIX, la fase líquida pasa sobre un soporte (fase estacionaria) retenido en una columna cromatográfica y es recogido el eluido en fracciones.

La **electroforesis capilar (EC)**, es una técnica reciente y representa un método alternativo a los anteriormente mencionados. Existen algunos pocos ejemplos de su uso en la determinación de niveles de flavonoles en material vegetal (Caridi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2005; Vaher y Koel, 2003; Wang y Huang, 2004). La separación se lleva a cabo, según la relación masa/carga de las distintas moléculas, por el movimiento diferencial de iones en un campo eléctrico. Se coloca un cátodo y un ánodo en una disolución conteniendo iones (medio electrolítico)

y se aplica un voltaje de modo que los analitos se separan y migran al electrodo de carga opuesta. Asimismo, la técnica se desarrolla en estrechos capilares (25 μm - 100 μm de diámetro interno), por lo que se produce un fenómeno denominado flujo electro-osmótico que se da debido a que la superficie interna del capilar está cargada que afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos (Ji *et al.*, 2014; Montero, 2003; Kvasnicka *et al.*, 2008). La EC es una técnica de alta resolución, sin paso de derivatización previo y corto tiempo de análisis. Sin embargo, presenta menor sensibilidad en términos de concentración de soluto y deficiente reproducibilidad, que otras técnicas cromatográficas (Ignat *et al.*, 2011; López *et al.*, 2008).

La **cromatografía líquida de alta resolución** (High-performance liquid chromatography, HPLC) es en la actualidad, el método más empleado para el análisis cuantitativo de *trans-resveratrol*, sin embargo, esta técnica requiere de etapas previas de extracción antes de la separación (Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Se fundamenta en el uso de presión elevada de la fase móvil líquida para mejorar la resolución y aumentar la velocidad de los compuestos. Ésta transporta la muestra a través de la columna cromatográfica y los analitos interactúan con la fase estacionaria de forma que los más afines con ésta fase avanzan más lentamente y eluirán más tarde. Una vez eluido el compuesto, debe ser detectado a la salida de la columna. Se produce un cromatograma que representa la respuesta del detector en el tiempo y donde cada analito está representado por un pico que poseerá el tiempo de retención (t_r). La intensidad del pico, será directamente proporcional a la concentración del analito correspondiente en la muestra.

Existen distintos tipos de HPLC según la naturaleza de la fase estacionaria: de partición, (líquido), de adsorción (sólido con propiedades superficiales), de cambio iónico (sólidos intercambiadores de iones), de afinidad (sólidos con propiedades de retención específicas) y de exclusión por tamaño (sólidos de porosidad controlada). Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo.

Una mejora introducida a la técnica, para lograr una mejor separación de compuestos, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis (elución en gradiente), según la hidrofobicidad del analito (Faulin, 2010).

Asimismo, según la naturaleza de la fase polar, predominan los estudios de separación y caracterización de estilbenos como la **Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)**, la cual consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras aquellas de carácter polar eluyen más rápidamente. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. Además, el tiempo de retención también aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto (Faulin, 2010; Sarria 2013).

Además, esta técnica permite el acoplamiento de numerosos sistemas de detección, entre los cuales, predominan para detectar estilbenos los detectores de UV-vis (Latouche *et al.*, 2013), de serie de diodos (DAD) (Zhang *et al.*, 2013), espectrometría de masas (MS) (Delgado de la Torre, 2012; Holthoff *et al.*, 2010; Huang y Mazza, 2011), resonancia magnética nuclear (NMR), electroquímica (Nemcová *et al.*, 2011), espectrofluorometría (Poutaraud *et al.*, 2007) y quimioluminiscencia (Bellow *et al.*, 2013).

Los espectros de fluorescencia del *trans*-resveratrol en solución metélica a 10 μ M, posee un máximo de excitación de fluorescencia alrededor de los 320 nm y un máximo de emisión de fluorescencia situado a 380 nm, igual que en la mayoría de los estilbenos. (Poutaraud *et al.*, 2007).

Se han aplicado combinaciones de los métodos mencionados para la determinación de estilbenos de interés en hojas de vid: HPLC-UV-MS (Anastasiadi *et al.*, 2012; Pawlus *et al.*, 2012, 2013), HPLC-MS-MS (Shoedl *et al.*, 2011), HPLC-ESI-MS/MS (Belchi-Navarro *et al.*, 2013; Vergara *et al.*, 2012), HPLC-PDA-ESI-MS (Schnee *et al.*, 2013), HPLC-APPI-MS (Jean-Dennis *et al.*, 2006), RP-HPLC-PDA-MS (Martin *et al.*, 2009), HPLC-ESI-MS (Belchi-Navarro *et al.*, 2013; Lijavetzki *et al.*, 2008; Tassoni *et al.*, 2012), HPLC-DAD-MS (Boubakri *et al.*, 2013; Delgado de la Torre, 2012; Mattivi *et al.*, 2011; Poutaraud *et al.*, 2011; Vrhovsek *et al.*, 2012;), HPLC-DAD-UV (Dani *et al.*, 2010; Godart *et al.*, 2009; Goncalves *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2014; Latouche *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013), RR-HPLC-UV (Almafitano *et al.*, 2011; Bavaresco *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2012; Santamaria *et al.*, 2010; Sgherri *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2012; Repetto *et al.*, 2012; Pussa *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2013), HPLC-Fluorometria (Lambert *et al.*, 2013; Bellow *et al.*, 2013; Triska *et al.*, 2012; Malacarne *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

La técnica de detección Resonancia magnética nuclear (NMR spectroscopy) acoplada a cromatografía de líquidos, tiene un rol importante para estudios de compuestos fenólicos, por sus ventajas en simplicidad en la preparación de la muestra y procedimientos de medición. Se aplican para la determinación de todos o algunos de los estilbenos de interés en hojas de vid (Ignat *et al.*, 2011).

Las técnicas analíticas HPLC y EC han sido empleadas exitosamente para la identificación y cuantificación de estilbenos en diferentes matrices y, debido a las ventajas y desventajas que presentan, se han generado numerosos estudios comparativos entre ambas.

Estos estudios demostraron que la metodología de análisis por HPLC es una técnica más repetible y reproducible, mientras que EC es más rápida, económica y menos contaminante.

La técnica EC resultó ventajosa en términos de costos por el gasto reducido de solventes, tiempos de análisis cortos, análisis cualitativos y/o cuantitativos en muestras concentradas y en casos de poca cantidad de muestra.

La técnica HPLC permitió el estudio de numerosas muestras en un corto período de tiempo con altos niveles de reproducibilidad, precisión, resolución y sensibilidad. Resultó más útil para análisis de tipo cuantitativo en muestras diluidas, en distintas matrices.

Consecuentemente, HPLC presentó desventajas desde los puntos de vista económico y ambiental, dados los altos costos de los solventes de grado HPLC, tiempo de análisis y los problemas inherentes a la disposición de los residuos químicos (Cala *et al.*, 2011).

En función de lo anteriormente expuesto, la decisión en el presente trabajo, de escoger la técnica de HPLC respecto de la técnica EC, se centró fundamentalmente en la disponibilidad de muestra, tiempo, reactivos necesarios, de un protocolo estandarizado certificado de análisis y cuantificación de resveratrol.

Se contó con la disponibilidad del equipo instrumental y colaboración técnica del Laboratorio de Aromas de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

3.1.5. Métodos de extracción para determinar estilbenos por HPLC en hojas de vid.

El uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV), para la determinación de resveratrol en hojas de vid, requiere necesariamente la optimización de las condiciones de extracción de los estilbenos.

Se citan numerosos métodos de extracción y la técnica de extracción líquido-líquido es la más frecuentemente utilizada. El solvente utilizado, la temperatura de extracción, el pH, y volumen de solvente por gramo de muestra, afectan fehacientemente, la eficiencia de extracción (Ignat *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

Asimismo, está demostrado que el complemento con ultrasonido, mejora notablemente la eficiencia de la extracción (Cho *et al.*, 2006).

En la Figura 3.3, se sintetizan los solventes más comunes y las temperaturas, más utilizados en métodos de extracción, extraídos de la bibliografía consultada.

| Metanol (MeOH) | | | | Etanol (EOH) | | | Etil-acetato | Acetona |
|--|-------------------------------|---|--|-----------------------------------|--|---|----------------------------|------------------------------------|
| MeOH puro | MeOH acidificado (pH=3) | Metanol de diferentes soluciones acuosas MeOH-H ₂ O | MeOH-H ₂ O acidificado | EOH puro | Etanol de diferentes soluciones acuosas EOH-H ₂ O | EOH-H ₂ O acidificado | puro | En solución acuosa |
| Extracción a temperatura ambiente | | | | | | | | |
| Alonso-Villaverde <i>et al.</i> , 2011; Babiková <i>et al.</i> , 2008; Coutos-Thévenot <i>et al.</i> , 2001; Goncalves <i>et al.</i> , 2008; Jeandet <i>et al.</i> , 2006, 2007; Ji <i>et al.</i> , 2013; Jiang <i>et al.</i> , 2012; Martin <i>et al.</i> , 2009; Pezet <i>et al.</i> , 2003; Poutaraud <i>et al.</i> , 2010; Shao <i>et al.</i> , 2007; Triska <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2010 | Tavares <i>et al.</i> , 2013; | Adrian <i>et al.</i> , 1996; Borie <i>et al.</i> , 2004; Douillet-Breuil <i>et al.</i> , 1999; Gutha <i>et al.</i> , 2010; Jeandet <i>et al.</i> , 1997a,b; Langcake <i>et al.</i> , 1979; Langcake, 1981; Langcake y Pryce, 1976; Lin <i>et al.</i> , 2012; Paul-Bernard <i>et al.</i> , 1998; Pussa <i>et al.</i> , 2006; Serazetdinova <i>et al.</i> , 2005. | Agati <i>et al.</i> , 2008; Anastasiadi <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2011, 2013. | Mattivi <i>et al.</i> , 2011. | Pussa <i>et al.</i> , 2006; Karacabey <i>et al.</i> , 2008; Vergara <i>et al.</i> , 2011, 2012; Cettin <i>et al.</i> , 2011; Tobar Reyes <i>et al.</i> , 2009. | Delgado <i>et al.</i> , 2012. | Wang <i>et al.</i> , 2013. | Pawlus <i>et al.</i> , 2012, 2013. |
| Extracción en baño refrigerado | | | | | | | | |
| Beldhadj <i>et al.</i> , 2008; 2011; Lambert <i>et al.</i> , 2013; Lambert, 2011; Schoedl <i>et al.</i> , 2011; Zhang <i>et al.</i> , 2011. | | | Schoedl <i>et al.</i> , 2011. | Tobar-Reyes <i>et al.</i> , 2009. | Timperio <i>et al.</i> , 2012. | Robert <i>et al.</i> , 2001. | | Dai <i>et al.</i> , 2012b. |
| Extracción a altas temperaturas | | | | | | | | |
| Boubakri <i>et al.</i> , 2013; Godard <i>et al.</i> , 2009; Jean-Dennis <i>et al.</i> , 2006; Latouche <i>et al.</i> , 2012; Poutaraud <i>et al.</i> , 2007; Reppeto <i>et al.</i> , 2012; Schnee <i>et al.</i> , 2008; Schimidlin <i>et al.</i> , 2008; Slaughter <i>et al.</i> , 2008; Steimez <i>et al.</i> , 2012; Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2012. | Lima, 2009. | | | | Dai <i>et al.</i> , 2012a; Dani <i>et al.</i> , 2010, 2012. | Delgado de la Torre <i>et al.</i> , 2012; Karacabey <i>et al.</i> , 2008. | | |

Figura 3.3. Solventes orgánicos utilizados para la extracción de estilbenos.

3.1.6. Sistemas de estudio de los compuestos fenólicos en vid frente a hongos asociados a enfermedades de madera

Existe escasa información acerca de los mecanismos de defensa de la vid frente a los hongos asociados a la Hoja de malvón y el Decaimiento de vides jóvenes. Una de las principales razones, radica en la dificultad de estudiar la interacción vid-enfermedades de madera a campo, debido a la complejidad de las mismas (conjunto de hongos involucrados) y a la expresión irregular de síntomas (afectados por factores ambientales).

Por otra parte, los resultados a campo plantean con frecuencia algunos problemas: son afectados por influencias estacionales y factores ambientales; no se separa el efecto del agente patógeno de los efectos provocados por otros factores bióticos y abióticos y además, porque principalmente, los ensayos de campo en plantas leñosas, exigen mucho tiempo y pueden tomar años. Los experimentos a campo presentan la desventaja de manifestar muchos parámetros que no se pueden controlar bien y además, los organismos exhiben una mayor variabilidad, incluso con el tiempo, que no puede ser realmente comprobada.

Se han publicado estudios con plántulas en condiciones *in vitro* que son consistentes con resultados *in vivo*, sugiriendo que los primeros podrían ser utilizados al menos como primeros avances (Lima *et al.*, 2012). Durante mucho tiempo, los modelos de experimentación *in vitro*, para estudios de susceptibilidad y patogenicidad, ocuparon un lugar importante en cuanto a la producción de conocimiento al respecto. Entre sus principales ventajas se mencionan la simplificación del sistema bajo estudio, la simplicidad de manipulación y el mejor control de factores externos que pueden interferir en las respuestas. Sin embargo, aunque valiosos, los resultados obtenidos pueden sustentar conclusiones erróneas debido a que células (cultivos celulares o callos) o plantas micropropagadas no funcionan de manera normal cuando se las aísla de su ambiente y la condición *in vitro* no puede sustituir las complejas interacciones hospedero-patógeno-ambiente que dominan la manifestación de una enfermedad por lo que la interpretación de los resultados puede resultar cuestionable. Asimismo, suele ser difícil extrapolar a partir de resultados *in vitro* a la biología del organismo y las interacciones patógeno-hospedero, en la naturaleza. Para tratar de resolver esta situación, se desarrolló un modelo experimental *in vivo*, en plantas mantenidas en invernáculo, que reproduce las características de los estudios *in vitro* y asimismo, pretende reflejar la complejidad del sistema vid-hongo de madera.

En cuanto al método de inoculación de plantas *in vitro* y en maceta, numerosos estudios han confirmado la efectividad de las inoculaciones según la técnica del disco micelial (Mycelial-plug technique) en vid (Arias, 2008; Baskarathevan *et al.*, 2010; Larignon, 2010; Laveau *et al.*, 2009; Péros *et al.*, 1997; Savocchia *et al.* 2007; Trouillas y Gubler, 2010; Taylor *et al.*, 2005; Urbez-Torrez *et al.*, 2008; Van Niekerk *et al.*, 2004), en eucalipto, (Chen *et al.*, 2011; Gezahgne *et al.*, 2004; Mohali *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009); en olivo (Lazzizzera *et al.*, 2008); en frutales y otras especies leñosas (Begoude *et al.*, 2010; Bihon *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2007; Golzar *et al.*, 2011; Heath *et al.*, 2010; Mehl *et al.*, 2011; Pavlic *et al.*, 2009; Pavlic *et al.*, 2007; Pooler *et al.*, 2002; Sakalidis *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2010; Thomidis *et al.*, 2011).

Cultivo *in vitro*

La reproducción asexual de plantas por cultivo *in vitro* es posible gracias a una propiedad de las células vegetales llamada totipotencialidad celular, que significa que: toda célula vegetal viva con núcleo sea cual fuere su “especialización” del momento, es capaz de reproducir fielmente la planta entera de la cual proviene, desarrollando un individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametas. Cada célula posee entonces la totalidad del patrimonio genético de la planta (Boutherin y Bron, 1994).

El término cultivo *in vitro* se aplica a todo cultivo en condiciones estériles. En general, la técnica consiste en tomar un fragmento de tejido vegetal (explanto), colocarlo en un medio nutritivo estéril y provocar (gracias a un equilibrio adecuado de los elementos del medio) el desarrollo de una plántula, libre de enfermedades y virus, en cámara de incubación, equipada de factores ambientales

(luz, temperatura, humedad relativa) optimizados para el cultivo, en este caso, de la vid. Los sistemas de cultivo *in vitro* de la vid, más comunes son: cultivo de meristemas, microinjertos, ápices de tallos, cultivo de tejidos o células (callos, protoplastos).

Para llevar adelante este trabajo, se necesita que el material a cultivar esté aséptico (ausencia de gérmenes, etc.) y además, que se cultive en un medio nutritivo estéril sólido, constituido principalmente por sales minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento y hormonas vegetales (citocininas y/o auxinas principalmente), azúcar (sacarosa), esenciales para la supervivencia de las plantas y un agente gelificante inerte (agar-agar). El pH de los medios de cultivo para vid suele variar entre 5 y 6,5. Requiere además, del uso de equipamiento que genere las condiciones necesarias de esterilidad, como los flujos laminares, que son estaciones de trabajo que hacen circular aire filtrado y estéril. Muestra las ventajas de mayor rapidez de multiplicación que por medios tradicionales, control de las condiciones ambientales, obtención de plantas de calidad porque evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios estériles, obtención de gran cantidad de individuos en espacios reducidos y fácil transporte, obtención de individuos uniformes y producción en períodos muy precisos, como el reposo vegetativo a campo. Sin embargo, el costo elevado es una desventaja así como también, las dificultades de éxito, en especial en las especies leñosas.

Micropropagación y rusticación de vides

La multiplicación tradicional de la vid por estacas, es un proceso lento y limitado por estacionalidad, mientras que la multiplicación de plantas *in vitro*, tiene la ventaja de ser menos complicada, permite disponer de material con mayor uniformidad que el proveniente de campo, establecimiento de stock considerable de plantas y obtención de plantas idénticas a la planta original. Una de sus aplicaciones más importantes es la obtención de plantas libres de virus y enfermedades, ya que los explantos utilizados no son afectados éstos los patógenos vegetales. Otra muy importante, es la multiplicación vegetal de organismos selectos en forma rápida y con la posibilidad de ocupar un espacio mucho más pequeño que si se desea propagar material en tierra.

La micropropagación se realiza a través del cultivo *in vitro* de meristemas, estacas uninodales (provenientes del nudo basal de la plántulas) como también de ápices caulinares (yema apical con la primera hoja expandida). Los medios de cultivo más utilizados han sido Murahige y Skoog (MS) (1962) con macro y micronutrientes diluidos a la mitad (estacas uninodales) y medio Galzy (GM) (ápices) adicionados de 30 g. L⁻¹ de sacarosa y solidificados con 7,5 g. L⁻¹ (Galzy, 1964; Galzy *et al.*, 1990; Guñazú *et al.*, 2005). Ravindra y Thomas (1995), señalan el éxito del uso de segmentos uninodales para micropropagación de vid (Anexo I). Existen estudios patogenicidad, en el patosistema vid-hongos de madera en plantas *in vitro* (Césari, 2004; Escoriaza *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2005; Zanzotto *et al.*, 2008), además de cultivos celulares (Belhadj *et al.*, 2008).

Las plantas micropropagadas de vid, con alta humedad relativa, bajo intercambio gaseoso, escasez de dióxido de carbono, producción de etileno, baja densidad fotosintética y ausencia de transpiración, sufren modificaciones importantes al transferirlas de condiciones *in vitro* a invernáculo. Su aclimatización es el paso más crítico de la micropropagación para su posterior supervivencia. Son especialmente susceptibles a la rápida deshidratación por lo tanto, al ser transferidas debe mantenerse una humedad relativa alta en el nuevo ambiente, para no dañar los mecanismos que mantienen el volumen de agua en la planta. La supervivencia de vides micropropagadas es relativamente baja comparada con otras especies leñosas (Ravindra y Thomas 1995). Fila *et al.*, (1998) demuestra que la aclimatización puede ser mejorada modificando gradualmente el microambiente durante el desarrollo *in vitro*, por ejemplo reduciendo la humedad relativa a través de ventilación. Asimismo, Amancio *et al.* (1999) confirman que cuando las plantas son transferidas a condiciones *in vivo*, a radiaciones más altas, puede ocurrir estrés de luz, incluyendo la fotoinhibición, la fotooxidación de la clorofila, lo último siendo revelado por clorosis y manchas secas que aparecen en la hoja. El control y la optimización de la luz, es también esencial, entonces, para la aclimatización satisfactoria.

Por todo lo expuesto, es que en este estudio se propone, la utilización de plantas *in vitro* y plantas en macetas obtenidas por rusticación a condiciones de invernáculo como sistemas para evaluar la susceptibilidad y/o tolerancia frente a *Lasiodyplodia theobromae* (Aroca y Raposo 2009; Baccari y Lindow, 2011; Camps, *et al.*, 2010; Hallen *et al.*, 2007; Larignon, 2010; Laveau *et al.*, 2009; Pitt *et al.*, 2013; Savocchia *et al.*, 2007; Travadon *et al.*, 2013; Úrbez-Torres y Gubler, 2009; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2006).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Hipótesis 1: A partir de estacas de vid de *Vitis vinifera* L. cvs Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*), se establecen plantas en condiciones *in vitro* y asimismo en maceta, en condiciones de invernáculo.

Objetivo 1: Optimizar los protocolos de obtención de vides en condiciones *in vitro* y de invernáculo, a partir de plantas de *Vitis vinifera* L. cvs Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*).

Producción de plantas *in vitro*

Se utilizaron plantas de *Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*), en frascos de vidrio de 250 cm³ conteniendo 50 ml de medio de cultivo de micropropagación de vid modificado de Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962), ajustado a pH 5,7 (Ver Anexo). Se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas (25 °C ± 2 °C, 16 h de luz blanca con 100 µE/min⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica).

Las plantas provinieron de ápices sanos de 3 cm obtenidos a partir de explantos de 50 días. Para cada uno de los cultivares, desarrollados al aire libre en la Estación Experimental ubicada en Luján de Cuyo, previamente indexados libre de virus, se seleccionaron brotes de 20 cm y desinfectaron con solución de 500 mg.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina, durante 3 días consecutivos. Al cuarto día, se extrajeron segmentos nodales de la región apical y los explantos se esterilizaron superficialmente con alcohol 70° durante 3 min y con una solución de hipoclorito de sodio al 0,6% y Tween-20 por 15 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y en cámara de flujo laminar. Posteriormente, los explantos se sembraron en tubos con 20 ml de medio de cultivo. El pH del medio se ajustó a 6,5 previo a la esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. Las plantas obtenidas se utilizaron para los ensayos *in vitro* y plantas en maceta.

Establecimiento y mantenimiento de vides en maceta en condiciones de invernáculo.

Las plantas en maceta, de *Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*), provinieron de vitoplantas de 2 meses (Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del INTA). El material vegetal creció en condiciones *in vitro* en cámara de cultivo para posteriormente producirse la rusticación del mismo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.Cuyo.

Las plantas se retiraron de la condición *in vitro*, sus raíces se lavaron cuidadosamente, para retirar restos adheridos de agar, y evitar con esto la proliferación de patógenos en el sustrato y se

sumergieron en una mezcla de Benlate más Captan, con una concentración de 1,2 g.L⁻¹ respectivamente por tres minutos.

Para el trasplante se utilizaron bandejas de germinación, previamente perforadas en la base para favorecer el drenaje, lavadas y asperjadas con una solución de hipoclorito de sodio (1%). Posteriormente, se procedió a llenar los contenedores a dos tercios de su capacidad con una mezcla de sustrato, previamente esterilizado en autoclave durante 1 h con 1 atm de presión y 121 °C. El sustrato correspondió a una mezcla húmeda de perlita fina y orujo agotado, estériles (1:1, v/v). Luego, se sumergió cada planta en una solución de hormona enraizante 4 s, y se trasplantó inmediatamente manejando con cuidado las raíces. A continuación, se cubrieron las bandejas con bolsas de polietileno transparente tamaño consorcio sobre un armazón de alambre galvanizado, parcialmente cerradas en el extremo y se colocaron en condiciones de 24 °C, con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y HR de 90 % a 100 %, mantenida a través de riego diario. Gradualmente se incorporó ventilación a cada bandeja, a través de orificios en la bolsa y se aumentó periódicamente la entrada de aire hasta retirar completamente la bolsa en 20 días, hasta igualar la HR del interior con la externa, la cual fue aproximadamente de 50 %. Se mantuvo esta condición durante un mes, a partir del cual se inició el transplante de las plantas rusticadas a maceta de 500 cm³ con el mismo sustrato estéril. Las plantas en maceta se mantuvieron para su crecimiento en cámara con condiciones óptimas de luz y temperatura (27 °C) por un mes más.

Las vides enraizadas y rusticadas durante dos meses, se plantaron en macetas de un litro en una mezcla de orujo agotado y perlita (1:1, v/v), previamente esterilizada, como sustrato. Posteriormente, las plantas se dispusieron en mesadas con distribución al azar, y fueron mantenidas en invernáculo con sistema de refrigeración evaporativo, a 27 °C. Se mantuvieron riegos cada dos días y fertilización semanal con Hakaphos verde (Compo) en dosis 1 g L⁻¹.

3.2.1. Análisis de las respuestas de defensa de *Vitis* spp. a *L. theobromae* en plantas en invernáculo.

Hipótesis 2: En nuestro medio, la vid está expuesta a enfermedades originadas por hongos de madera y posee un sistema de defensa por el cual puede detectar y responder a la presencia de los patógenos asociados.

Objetivo 2: Identificar y evaluar respuestas de defensa de *Vitis* spp. frente a la inoculación con *Lasiodiplodia theobromae*, empleando parámetros de crecimiento *in vitro* y en condiciones de invernáculo.

Material fúngico

Se utilizó el ascomicete *Lasiodiplodia theobromae* (B000, Colección micológica de laboratorio de Fitopatología, INTA EEA Mendoza) por ser el patógeno más frecuentemente aislado

de vides con decaimiento y Hoja de malvón. Asimismo, su patogenicidad fue previamente comprobada en plantas cultivadas *in vitro* y en condiciones a campo (Gatica *et al.*, 2000, 2004). Se obtuvieron aislamientos del hongo, de tejidos de madera de vid cv. Chenin con síntomas de Hoja de malvón y se hicieron crecer cultivos monospóricos en medio APG y oscuridad a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante siete días.

Inoculaciones y parámetros de crecimiento evaluados

Para estudiar las respuestas de defensa de la vid en plantas de invernáculo, frente a cultivos monospóricos de *L. theobromae*, se efectuaron inoculaciones controladas siguiendo los Postulados de Koch (Agrios, 1996). Se inocularon 20 vides enraizadas de tres meses, por cada uno de los nueve cultivares en estudio, dispuestas en cuatro repeticiones con cinco plantas por repetición. Los inóculos consistieron en un disco de cuatro mm, del micelio marginal del cultivo monospórico de *L. theobromae*, creciendo en APG estéril, dispuesto sobre la madera.

Siguiendo el mismo procedimiento, se inocularon al azar, 20 vides de los nueve cvs. seleccionados, en cuatro repeticiones, con fragmentos de APG, sin micelio fúngico, que fueron utilizados como controles. En total se utilizaron 360 plantas de vid. La zona de la planta donde se realizó la inoculación fue previamente desinfectada en la superficie, con etanol al 70 %. Posteriormente se realizó una herida en el tallo de cada vid con ayuda de un bisturí estéril, entre la tercera y cuarta hoja desde la base. En los cortes de poca profundidad y aproximadamente de 1,9 cm de longitud, se depositó el inóculo. Antes de sellar el corte con Parafilm®, se colocó un algodón embebido en agua destilada estéril para evitar la desecación. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (entre 70 % y 80 %) con luz natural, durante dos meses (enero y febrero).

La efectividad de las inoculaciones fue comprobada mediante el reaislamiento de *L. theobromae*, de la zona de inoculación. Cinco fragmentos de tejido, de la zona inoculada, fueron depositados en cajas de Petri con medio APG y cultivados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, en oscuridad hasta que el tamaño de las colonias obtenidas fue suficiente para identificarlas por métodos morfológicos e identificar el patógeno.

Los controles y plantas inoculadas, se observaron periódicamente para determinar la evolución de síntomas producidos por *L. theobromae*. Luego de 21 días en invernáculo bajo condiciones controladas, cuando el primer cultivar inoculado alcanzó el 70 % de plantas con síntomas en follaje respecto del total, y para evitar la colonización secundaria de hongos saprofitos que alterara las plantas muertas, se registraron: porcentaje de plantas con síntomas por cultivar, número y porcentaje de hojas muertas por planta, presencia o ausencia de brotación de yemas situadas por encima y por debajo de la inoculación, contenidos de clorofila en hojas superior e inferior a la inoculación y el grado de síntomas en la lesión producida por la inoculación, siguiendo la escala: micelio incipiente sobre lesión, micelio severo sobre la lesión, avance de lesión

con micelio y madera muerta. Posteriormente, se llevó a cabo el reaislamiento del patógeno en medio APG.

El contenido de clorofila se midió con el equipo Minolta Modelo SPAD-502. Este equipo determina el contenido relativo de clorofila midiendo la absorbancia de la hoja en dos regiones del espectro de luz visible (400-500 nm y 600-700 nm), con los valores de transmitancia en ambas regiones, el aparato calcula un valor numérico que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. Luego de la calibración, se colocó la hoja dentro de la ranura de medición del aparato y se efectuó la lectura. Para esta determinación se utilizaron las hojas por encima y por debajo del punto de inoculación.

Se estableció tolerancia en función de los parámetros evaluados.

3.2.2. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas en invernáculo e inoculadas con el hongo *L. theobromae*

Hipótesis 3: En vid, el ataque de especies de *Botryosphaeriaceae* promueve la síntesis de fitoalexinas de naturaleza estilbénica: resveratrol y derivados. Por lo que es posible establecer una escala de tolerancia de distintos cultivares de vid, al hongo *L. theobromae*, en función de sus respuestas de defensa y producción de resveratrol.

Objetivo 3: Desarrollar un método de extracción e identificación de resveratrol y/o sus derivados en hoja, a partir de plantas en maceta en condiciones de invernáculo, determinar si el ataque del hongo *L. theobromae* promueve su producción y definir una escala de tolerancia para las *Vitis* spp. en función de las respuestas de defensa obtenidas y la producción de resveratrol frente al ataque del patógeno.

a) Puesta a punto de método de extracción de resveratrol

Se seleccionaron plantas *in vitro* de *Vitis rupestris*, de 2 meses de edad, con ocho a diez hojas funcionales, mantenidas *in vitro* en tubos de ensayo con medio MS, con el objeto de optimizar las condiciones de extracción, para medir resveratrol y sus variantes en hoja, por la técnica HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución).

Se inocularon 27 vides con fragmentos de micelio de *L. theobromae* (ver apartado 3.2.1) e igualmente, se inocularon fragmentos de APG estéril, en las 27 vides controles. Se evaluaron diferentes métodos para la obtención de extractos, a partir de las referencias existentes de diferentes autores citadas en la introducción. Para cada extracción (n=3 repeticiones por muestra), se utilizaron 100 mg de hojas molidas a polvo fino con nitrógeno líquido y agregado de fluoruro de sodio Merck (25 mg / 100 mg de hoja). Según estudios previos, al tercer día de la inoculación, en iguales condiciones, las plantas mostraron el mayor contenido de resveratrol (Césari, comunicación personal). Por ende, se extrajeron al tercer día, la tercera, cuarta, quinta y sexta hojas sin pecíolo,

desde la base de cada planta. Se pesaron 100 mg de hojas congeladas molidas con nitrógeno líquido y se colocaron en tubos estériles de 2,5 mL con tapa rosca, sellados con parafilm® y protegidos de la luz. Se mantuvieron a -85 °C en freezer hasta su análisis.

Se empleó un diseño factorial en dos bloques, para determinar las condiciones óptimas de un rango de 5 parámetros: extractante utilizado, tiempo de extracción, utilización de agitación o ultrasonido, temperatura de extracción y pH (Tabla 1.1).

Tabla 3.1. Evaluación de métodos de extracción en un diseño factorial (Design Expert 7) con cinco variables de extracción. en condiciones de oscuridad. MeOH = Metanol grado analítico para HPLC; MeOH / H₂O = Metanol grado analítico para HPLC en solución acuosa 8:2.

| Muestra n° | Orden extracción | Bloques | Factores | | | | | | | | | |
|------------|------------------|----------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|--------|-----------------|----|-------|----|------|
| | | | Extractante (A) | Tiempo de extracción (min) (B) | Agitación-ultrasonido (C) | Temperatura (°C) (D) | pH (E) | | | | | |
| 1 | 15 | Bloque 1 | A1 | MeOH / H ₂ O | B1 | 60,00 | C1 | con ultrasonido | D1 | 60,00 | E1 | 3,00 |
| 2 | 8 | Bloque 1 | A2 | MeOH | B1 | 60,00 | C2 | con agitador | D1 | 60,00 | E2 | 7,00 |
| 3 | 14 | Bloque 1 | A1 | MeOH / H ₂ O | B1 | 60,00 | C2 | con agitador | D1 | 60,00 | E1 | 3,00 |
| 4 | 5 | Bloque 1 | A2 | MeOH | B1 | 60,00 | C1 | con ultrasonido | D1 | 60,00 | E2 | 7,00 |
| 5 | 1 | Bloque 1 | A2 | MeOH | B2 | 10,00 | C1 | con ultrasonido | D2 | 0,00 | E1 | 3,00 |
| 6 | 10 | Bloque 1 | A1 | MeOH / H ₂ O | B2 | 10,00 | C2 | con agitador | D2 | 0,00 | E2 | 7,00 |
| 7 | 11 | Bloque 1 | A1 | MeOH / H ₂ O | B2 | 10,00 | C1 | con ultrasonido | D2 | 0,00 | E2 | 7,00 |
| 8 | 4 | Bloque 1 | A2 | MeOH | B2 | 10,00 | C2 | con agitador | D2 | 0,00 | E1 | 3,00 |
| 9 | 7 | Bloque 2 | A2 | MeOH | B1 | 60,00 | C1 | con ultrasonido | D1 | 60,00 | E1 | 3,00 |
| 10 | 6 | Bloque 2 | A2 | MeOH | B1 | 60,00 | C2 | con agitador | D1 | 60,00 | E1 | 3,00 |
| 11 | 13 | Bloque 2 | A1 | MeOH / H ₂ O | B1 | 60,00 | C1 | con ultrasonido | D1 | 60,00 | E2 | 7,00 |
| 12 | 2 | Bloque 2 | A2 | MeOH | B2 | 10,00 | C2 | con agitador | D2 | 0,00 | E2 | 7,00 |
| 13 | 12 | Bloque 2 | A1 | MeOH / H ₂ O | B2 | 10,00 | C2 | con agitador | D2 | 0,00 | E1 | 3,00 |
| 14 | 3 | Bloque 2 | A2 | MeOH | B2 | 10,00 | C1 | con ultrasonido | D2 | 0,00 | E2 | 7,00 |
| 15 | 16 | Bloque 2 | A1 | MeOH / H ₂ O | B1 | 60,00 | C2 | con agitador | D1 | 60,00 | E2 | 7,00 |
| 16 | 9 | Bloque 2 | A1 | MeOH / H ₂ O | B2 | 10,00 | C1 | con ultrasonido | D2 | 0,00 | E1 | 3,00 |

Se realizaron 16 extracciones separadas en tubos de 1,5 mL, utilizando metanol Lichrosolv (100%) y en agua millipore (8:2 v/v), y combinaciones con tiempos de extracción de 10 min y 60 min; dos temperaturas 0 °C y 60 °C, y dos pH (pH = 3 ajustado con ClH 0,1N - pH = 7 sin ajustar). Se mantuvieron constantes el volumen de extractante (1mL) y la masa de muestra (100 mg) y, en todos los casos las muestras se extrajeron en oscuridad. Posteriormente, se centrifugaron 10 min a 6000 rpm en centrífuga CM4080 Rolco. El líquido sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon Microclar, de tamaño de poro de 0.45 µm y se traspasó a viales de vidrio ámbar con tapa

rosca y septa de silicona/PTFE (Varian, EEUU), los mismos se pasaron por ultrasonido en frío 1 min y se guardaron en freezer hasta su análisis.

Se determinaron por triplicado, compuestos fenólicos totales por lectura directa de la absorbancia de las muestras colocadas en cubetas de cuarzo de 1cm (dilución con MeOH, 1:100) a 280 nm, en Espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer serie Lambda 25 (PerkinElmer, Hartford, CT, Estados Unidos). Los datos se analizaron por ANOVA, con Design Expert7. Se seleccionó el extracto con mayor absorbancia correspondiente a concentración, de polifenoles totales.

b) Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD).

Para cada uno de los nueve cultivares analizados, 21 días después de la inoculación en condiciones de invernáculo, se extrajeron las hojas superior e inferior al punto de inoculación, de un pool de 4 plantas por repetición (n = 4). Las muestras compuestas, contenidas en un sobre de papel aluminio, mantenidas en frío, se llevaron a freezer -80 °C hasta posterior análisis. De igual forma, se procedió con los controles. Para cada ensayo, se llevó a cabo la obtención de extractos, según los resultados obtenidos del ítem (3.2.2 a), por agregado de MeOH, pH=3 y sonicación en baño de hielo por 10 min, clarificado por centrifugación y el sobrenadante filtrado y transferido a viales con protección fotoquímica.

La cuantificación de resveratrol se realizó por inyección directa del extracto por cromatografía en fase líquida de alta resolución HPLC-DAD (UV-Vis). El extracto se filtró a través de membrana de nylon Microclar (0,45 mm tamaño de poro) y el volumen de inyección de muestra fue de 30 µl. La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna C18 Nova-Pak, a 25 °C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido acético, 98:2, v/v) y B (agua/acetonitrilo Lichrosolv/ácido acético, 78:20:2, v/v/v), aplicados con un flujo de 0,9 mL min⁻¹ desde 0 a 55 min., y de 1 mL min⁻¹, desde 55 a 125 min, según el programa descrito en la Tabla 1.2, finalizando con un lavado con metanol durante 5 min y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. La detección fue realizada en longitudes de onda en DAD: 210 nm a 360 nm (Fanzone *et al.*, 2010).

Tabla 3.2. Diagrama de flujo del gradiente de solventes para la separación cromatográfica por HPLC-DAD.

| Tiempo | Gradiente | Duración |
|--------------|-----------------------------|----------|
| 0 - 55 min. | 100 - 20 % A + 0 - 80 % B | 55 min. |
| 55 - 57 min. | 20 - 10 % A + 80 - 90 % B | 2 min. |
| 57 - 70 min. | 100 % A + 90 % B isocrático | 13 min. |
| 70 - 80 min. | 10 - 0 % A + 90 - 100 % B | 10 min. |
| 80 - 125 min | 100 % B isocrático | 45 min. |

La identificación de los compuestos individuales (*Trans*-resveratrol, *Trans*-resveratrol glicosidado y *Cis*-resveratrol glicosidado), se realizó por comparación de espectros y tiempos de retención con estándares comerciales, según el método del estándar externo y las curvas de calibración para cada estándar fueron obtenidas por inyección de soluciones patrones (quintuplicado), bajo las mismas condiciones que las muestras problema (Fanzone, 2012).

3.2.3. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas *in vitro* e inoculadas con el hongo *L. theobromae*.

Hipótesis 4: En vid mantenida en condiciones *in vitro*, *L. theobromae* promueve la producción diferencial de resveratrol en el tiempo, en un cultivar tolerante respecto una susceptible.

Objetivo 4: Estudiar en el sistema *in vitro*, la producción de resveratrol en un cultivar susceptible y una tolerante, a las 8 h, 24 h y 48 h desde la inoculación con *L. theobromae*

Inoculaciones y parámetros de crecimiento evaluados

Se inocularon en condiciones estériles en campana de flujo laminar, 45 plantas de cv. Malbec y de *Vitis rupestris*, respectivamente, dispuestas en frascos de vidrio con medio Murahige y Skoog (MS) (1962) con macro y micronutrientes diluidos a la mitad. Los inóculos consistieron en un disco de cuatro mm, del micelio marginal del cultivo monospórico de *L. theobromae*, creciendo en APG estéril, dispuesto sobre una incisión en la zona basal de cada tallo, con bisturí estéril. Siguiendo el mismo procedimiento, se inocularon 30 vides por cultivar, con fragmentos de APG, sin micelio fúngico, como controles. Los frascos de vidrio se cerraron con film adherente y se mantuvieron en cámara de cultivo a 25 °C, con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, hasta la aparición de síntomas.

Las vides inoculadas con *L. theobromae* y con micelio estéril de cv. Malbec y de *Vitis rupestris*, se observaron a las 8 h, 24 h., 48 h, 72 h, 96 h y 120 h post-inoculación y se registró la presencia de clorosis o necrosis en hojas, considerados como síntomas de la enfermedad en condiciones *in vitro*. El estado de cada planta se estimó con una escala ordinal (0-3) basada en la determinación visual de síntomas modificada de Zanzotto *et al.*, (2008): 0 = hojas verdes sin síntomas; 1 = hoja con necrosis o manchas rojas; 2 = hojas y tallos castaños y 3 = hojas y tallo competamente necróticos (muerto) con presencia de micelio del hongo.

Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC-DAD).

Se analizó el contenido de resveratrol y sus variantes, en un total de 45 plantas *Vitis vinifera* cv. Malbec y 45 plantas de *Vitis rupestris* a las 8 h, 24 h, 48 h y 72 h post-inoculación con *L. theobromae*. Para cada repetición de cada cultivar inoculado, se extrajeron las hojas superior e

inferior al punto de inoculación, de un pool de 3 plantas por repetición ($n = 3$), en función del material vegetal disponible. De igual forma se procedió con las 30 plantas control de cada cultivar. Las muestras compuestas, contenidas en un sobre de papel aluminio, mantenidas en frío, se llevaron a freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta posterior análisis.

Se llevó a cabo la obtención de extractos, según los resultados obtenidos del ítem 3.2.2 a), por agregado de MeOH, $\text{pH}=3$ y sonicación en baño de hielo por 10 min, clarificado por centrifugación y el sobrenadante filtrado y transferido a viales con protección fotoquímica. La cuantificación de resveratrol se realizó según materiales y métodos detallados en ítem 3.2.2.b).

3.2.4. Análisis de los datos

En los estudios de tolerancia y susceptibilidad en plantas *in vitro* e invernáculo, las diferencias entre inoculados y control se determinaron a través del test de Kolmogorov-Smirnov ($P=0.05$). El estudio estadístico de los datos, para determinar el grado de tolerancia entre los distintos cultivares inoculados, se realizó por métodos multivariados: a través del análisis factorial de componentes principales (ACP) y correspondencias simples (ACS), según la naturaleza de los datos; el análisis simultáneo de varios parámetros medidos sobre el mismo conjunto de individuos, en caso de múltiples tablas, por Análisis Factorial Múltiple (AFM); la identificación de medias esperadas y diferencias significativas a través de DESCOCO (Descripción de variables Continuas) y DEMOD (Descripción de Modalidades o categorías). El método DESCOCO, se basa en múltiples análisis de varianza, que utilizan como valor de prueba el Valor de Test (V_{test}), índice descriptivo que normaliza los datos en el proceso y no es necesaria la comprobación de la normalidad de los datos requerido en los métodos paramétricos de comparación de medias. Asimismo, no requiere previo al método especificar el nivel de significación ya que muestra los resultados en todos los niveles de significación estadística. El método DEMOD, utiliza el Valor de Test como valor de prueba para caracterizar grupos, clases o categorías de una variable nominal. Para analizar las tablas de contingencia (asociación a través de medias) se utilizó el *test Chi Cuadrado*, prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos y más de dos muestras independientes. Su función es comparar dos o más distribuciones y determinar que la diferencia no se deba al azar (Langrand & Pinzón, 2009). Para la puesta en práctica de la estrategia de análisis se utilizó el *software de libre distribución* para uso académico DTM-Minería de Datos y Textos, que trata la estadística exploratoria multidimensional datos complejos, incluyendo datos numéricos y textuales (Lebart, 2007), y paquete FactoMineR del entorno R, también de licencia académica (Husson, 2007).

3.3. RESULTADOS

Producción de plantas *in vitro*

Se obtuvieron plantas de *Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay, Malbec, Pinot Noir, Pedro Giménez, Criolla Chica, y *Vitis* spp. (110R, 5BB, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*), de manera exitosa, por micropropagación, cultivadas en medio de cultivo MS, libre de virus y enfermedades, con desarrollo óptimo a los 40 días desde el repique uninodal en el medio de cultivo (Figura 3.4).



Figura 3.4. Vides *in vitro* obtenidas por establecimiento de los segmentos uninodales en medio de micropropagación de vid MS.

Establecimiento y mantenimiento de vides en maceta en condiciones de invernáculo.

Se lograron aclimatar plantas en maceta provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, con un desarrollo óptimo a los 90 días desde su transplante. (Figura 3.5).



Figura 3.5. Plantas en maceta que se desarrollaron a partir de la rusticación de plantas *in vitro*.

3.3.1. Análisis de respuesta de defensa de *Vitis* spp a *L. theobromae* en plantas en plantas en invernáculo.

L. theobromae inoculado en plantas de distintos cultivares de vid, causó secado de hojas, brote y muerte del brote en todas las plantas inoculadas variando el número de plantas afectadas varió según el cultivar en estudio.

El cultivar Malbec comenzó a desarrollar síntomas foliares al quinto día desde la inoculación con *L. theobromae*. Los cvs. Pedro Gimenez, Chardonnay, el portainjerto 5BB, *V. riparia*, el portainjerto 110R y Pinot Noir desarrollaron síntomas a partir de los 13 y 14 días; el cv. Criolla chica a los 15 días y *Vitis rupestris* a los 20 días. Ninguna planta control desarrolló síntomas en follaje (Figura 3.6).



Figura 3.6. Síntomas observados en vides inoculadas con *L. theobromae*, a los 21 días de inoculación. (A) y (B) hojas secas, enrojecimiento y muerte del brote inoculado, (C) controles inoculados sin muerte de brotes.

Cuando se compararon los cultivares inoculados frente las plantas control, el % de plantas con menor contenido de clorofila $\text{Prob}>F=0,002$, presencia de síntomas $\text{Prob}>F=0,000$, muerte de hojas $\text{Prob}>F=0,001$ y con brotación post-inoculación $\text{Prob}>F=0,000$, fueron significativamente mayores en plantas inoculadas con *L. theobromae* que en los controles sin patógeno (95% certeza para $P=0.01$). Los controles mostraron valores nulos para % de plantas con síntomas, % de muerte de hojas y % de brotación post-inoculación.

Todas las plantas inoculadas, manifestaron necrosis bien marcadas con desarrollo de micelio negro en la herida de inoculación, aunque en diferente grado según el cultivar. Las plantas control mostraron heridas bien cicatrizadas y en ninguna de ellas se observó producción de micelio en torno al punto de inoculación (Figura 3.7).



Figura 3.7. Avance de necrosis y producción de micelio en punto de inoculación en planta de Malbec inoculada con *L. theobromae* (B) y control sin síntomas (A), a los 21 días de inoculación.

Las diferencias significativas que resultaron de múltiples comparaciones entre los cultivares inoculados con *L. theobromae*, se muestran en la Tabla 3.3. Transcurridos 21 días de la inoculación, los cultivares Malbec (69%) y Chardonnay (50%) presentaron los mayores % de plantas con síntomas. Contrariamente, *Vitis rupestris* y el cultivar Criolla Chica, con 12,5%, mostraron los menores valores (asociados a los signos negativos del valor Test). Además, *V. rupestris* y el cultivar Criolla chica presentaron los menores % de muerte de hojas, contrariamente, el cultivar Malbec, los mayores porcentajes.

Por otro lado, *V. rupestris* y el cultivar Criolla Chica, presentaron mayores contenidos de clorofila medidos con el SPAD, mientras que el cultivar Malbec presentó los valores más bajos. En plantas de *V. rupestris* y *V. riparia* inoculadas con el hongo, se observó el rebrote por debajo del punto de inoculación de forma altamente significativa, así como también, en plantas inoculadas de 5BB y Pinot Noir de forma significativamente probable.

Al analizar las relaciones significativas entre cultivar inoculado y la longitud de las necrosis y los distintos grados de afectación de la lesión, en Malbec y Chardonnay, se comprobó que las lesiones del hongo se extendieron más allá de la zona de inoculación inicial (valor Test 1,65-1,94, $p < 0,10$). Esto no se observó en el resto de los cultivares. Asimismo, se verificó con 99 % de certeza (valores Test $\geq 2,58$), la muerte de tejidos en zona de inoculación y tallo, para el cv. Malbec y el portainjerto 5BB, mientras que *V. rupestris* y el cultivar Criolla Chica no mostraron muerte de tejidos ni de tallo (Tabla 3.3). A partir de las plantas inoculadas, se recuperaron fragmentos afectados de la zona de inoculación y se aisló *L. theobromae* en un 100 %, para todos los cultivares. No se reaisló el hongo en las plantas controles, como era de esperar.

Tabla 3.3. Variables asociadas a tolerancia de vides frente a *L. theobromae*, mantenidas durante 21 días en invernáculo (Valor Test¹ se utilizó como valor crítico de prueba).

| VARIEDAD | Modalidad de la variable característica | valor Test | p-value asociado | Modalidad y/o X ± σ clase | X ± σ General |
|---------------|---|------------|------------------|---------------------------|---------------|
| Malbec | % de Hojas muertas | 3,54 | 0,000 *** | 24,48±19,3 | 10,30±16,69 |
| | Lesión con grado "muerta" | 3,54 | 0,000 *** | | SI |
| | Presencia de síntomas al día 21 (sí/no) | 3,07 | 0,001 *** | | SI |
| | Avance de la lesión | 1,72 | 0,044 * | | SI |
| | Clorofila Hoja inferior (SPAD) | -1,85 | 0,032 * | 21,01±2,8 | 22,78±4,05 |
| | Brotación superior a la inoculación (sí/no) | -1,99 | 0,023 ** | | NO |
| | Clorofila Hoja superior (SPAD) | -2,04 | 0,021 ** | 21,02±2,9 | 22,75±3,59 |
| | Lesión con grado "mucho micelio" | -2,73 | 0,003 ** | | NO |
| Chardonnay | Presencia de síntomas al día 21 (sí/no) | 1,70 | 0,021 * | | SI |
| | Avance de la lesión | 1,82 | 0,023** | | SI |
| 5BB | Brotación superior a la inoculación (sí/no) | 3,20 | 0,001 *** | | SI |
| | Lesión con grado "muerta" | 2,61 | 0,010 * | | SI |
| | Lesión con poco micelio | -1,61 | 0,044 * | | NO |
| Pinot Noir | Brotación superior a la inoculación (sí/no) | 1,79 | 0,044 * | | SI |
| | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | 1,90 | 0,044 * | | SI |
| 110R | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | -2,09 | 0,032 * | | NO |
| | Lesión con grado "mucho micelio" | 1,79 | 0,040 * | | SI |
| V. riparia | Lesión con poco micelio | 6,68 | 0,000 *** | | SI |
| | Brotación superior a la inoculación (sí/no) | 3,49 | 0,000 *** | | SI |
| | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | 3,20 | 0,001 *** | | SI |
| | Lesión con grado "mucho micelio" | -4,32 | 0,000 *** | | NO |
| P. Gimenez | Lesión con grado "mucho micelio" | 2,03 | 0,021** | | SI |
| | Brotación superior a la inoculación (sí/no) | -1,99 | 0,023 * | | NO |
| | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | -2,61 | 0,004 *** | | NO |
| Criolla Chica | % de Hojas muertas | -2,08 | 0,019 *** | 2,21±7,1 | 10,30±16,69 |
| | Clorofila Hoja inferior (SPAD) | 2,09 | 0,0180 | 24,78±3,9 | 22,78±4,05 |
| | Clorofila Hoja superior (SPAD) | 1,80 | 0,001 *** | 24,79±1,7 | 22,75±3,59 |
| | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | -4,20 | 0,000 * | | NO |
| | Presencia de síntomas al día 21 (sí/no) | -1,94 | 0,026 ** | | NO |
| | Lesión con grado "mucho micelio" | -1,90 | 0,029 ** | | NO |
| V. rupestris | Brotación inferior a la inoculación (sí/no) | 2,67 | 0,004** | | SI |
| | Lesión con grado "mucho micelio" | 2,56 | 0,005 ** | | SI |
| | Clorofila Hoja superior (SPAD) | 2,41 | 0,008 *** | 24,79±1,59 | 22,75±3,59 |
| | Clorofila Hoja inferior (SPAD) | 2,09 | 0,000 *** | 24,78±3,1 | 22,78±4,05 |
| | Lesión con grado "muerta" | -1,90 | 0,029 ** | | NO |
| | Presencia de síntomas al día 21 (sí/no) | -1,94 | 0,026 * | | NO |
| | % de Hojas muertas | -2,08 | 0,020 *** | 2,1±7,17 | 10,30±16,69 |

¹ Valor Test es el valor crítico de prueba (Lebart *et al.*, 1995). El signo del V test determina la relación de la variable con la clase en sus valores altos (+) o valores (-). Cuando valor Test en valor absoluto ≥ 2,58 (99% certeza, p<0,001), el caso es altamente significativo***; entre 1,93-2,58 (95%certeza, p<0,01) el caso es significativamente probable**; entre 1,65-1,94 (90% certeza, p<0,10) es significativamente poco probable* y <1,64 altamente no significativo (NS).

3.3.2. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas en invernáculo e inoculadas con el hongo *L. theobromae*.

a) Puesta a punto de método de extracción de resveratrol

Se obtuvieron los extractos a partir de hoja y efectuaron las lecturas de absorbancia, siguiendo los diferentes métodos evaluados. El modelo bifactorial que incluyó las variables “método” y “extractante”, resultó significativo con un 95 % de certeza: $(\text{Prob}>F)= 0,0085 < 0,01$. Los valores críticos de significación estadística (valores Test), corroboraron el efecto de ambas variables en la extracción de compuestos fenólicos. La temperatura de extracción, tiempo y el pH no tuvieron efecto en la extracción (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Resultados de ANOVA multifactorial mostrando la significancia de distintos factores considerados en la extracción de compuestos fenólicos de hoja de *Vitis*. El Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba².

| Factores | p-value asociado | valor Test |
|-------------|------------------|------------|
| Método | 0,0095 *** | 2,60 |
| Temperatura | 0,2576 NS | 0,99 |
| Tiempo | 0,5525 NS | -0,59 |
| Extractante | 0,0668 * | 1,83 |
| pH | 0,601 NS | -0,52 |

En la Tabla 3.5 se resumen las modalidades más significativas de los factores, en función del valor Test, las cuales caracterizan los valores más altos de absorbancia correspondientes a mayores contenidos de compuestos fenólicos. Se obtuvieron mayores absorbancias en las extracciones *con ultrasonido*, respecto la agitación (valor Test negativo). En la comparación de metanol puro frente a la solución acuosa (8:2, v/v), las mayores absorbancias correspondieron al *metanol puro*.

La temperatura de extracción de 0°C produjo mayores absorbancias que a 60°C (NS), coincidente con las condiciones optimizadas en experimentos previos. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre el metanol a pH=7 y el mismo, acidificado con la solución 0,1% de ClH (pH=3), los resultados indican entonces, que no es necesario acidificar el solvente durante la extracción de compuestos fenólicos. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el tiempo de extracción, por lo que se optimizaron las condiciones utilizando el menor tiempo extracción (10 min).

² Se utilizó el valor Test como criterio que evalúa estadísticamente, a través de múltiples ANOVAs, la desviación entre la medida sobre el grupo y la medida sobre la población expresada en número de desviaciones tipo de una ley normal (Lebart *et al.* 1995). Cuando valor Test en valor absoluto $\geq 2,58$ (99% certeza, $p < 0,001$), el caso es altamente significativo***; entre 1,93-2,58 (95% certeza, $p < 0,01$) el caso es significativamente probable**; entre 1,65-1,94 (90% certeza, $p < 0,10$) es significativamente poco probable* y $< 1,64$ altamente no significativo (NS).

Tabla 3.5. Absorbancia media (n=3) obtenida por espectrofotometría y desvío típico correspondiente a las distintas modalidades de cada variable de extracción de compuestos fenólicos. El Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba².

| VARIABLES DE EXTRACCIÓN | Modalidad de la variable | valor Test | p-value asociado | $\bar{X} \pm \sigma$ |
|-------------------------|--------------------------|------------|------------------|----------------------|
| Método | Ultrasonido | 2,41 | 0,0080 ** | 1,26±0,22 |
| Extractante | MeOH | 1,74 | 0,0610 * | 1,20±0,26 |
| Temperatura | 0 °c | 0,90 | 0,184 NS | 1,16±0,30 |
| Tiempo | 10 min | 0,46 | 0,322 NS | 1,13±0,32 |
| pH | ph 7 | 0,41 | 0,343 NS | 1,12±0,32 |
| pH | ph 3 | -0,41 | 0,343 NS | 1,07±0,21 |
| Tiempo | 60 min | -0,46 | 0,322 NS | 1,06±0,21 |
| Temperatura | 60 °C | -0,90 | 0,184 NS | 1,03±0,23 |
| Extractante | MeOH + H2O (8:2) | -1,74 | 0,061 * | 0,99±0,25 |
| Método | Agitación | -2,41 | 0,0080 ** | 0,92±0,20 |

El método seleccionado para la determinación de estilbenos por cromatografía líquida de alta resolución consistió en: fraccionar en tubo eppendorf (2 ml, con tapa rosca) 100 mg de polvo molido con nitrógeno líquido, obtenido de hojas de vid sin pecíolo, mantenidos a -85 °C y siempre protegidos de la luz; adicionar al tubo, 1 ml de Metanol (10:0) a pH =7; homogeneizar en vórtex durante 30 s; mantener en baño refrigerado con ultrasonido por 10 min; centrifugar 10 min a 6.000 rpm y transferir el sobrenadante a vial color caramelo, previa filtración a través de una membrana de nylon, de tamaño de poro de 0.45 µm; aplicación de ultrasonido en frío 1 min y conservación en freezer.

b) Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC-DAD).

Se cuantificaron por HPLC, en vides inoculadas con *L. theobromae*, *Trans*-resveratrol, *Trans*-resveratrol glicosidado y *Cis*-resveratrol glicosidado. El 100 % de las plantas control, presentó ausencia de éstos estilbenos, con concentraciones por debajo del límite de detección del análisis HPLC, presentando diferencias altamente significativas respecto las plantas inoculadas (p-value = 0,0000).

Por otro lado, se detectaron diferencias altamente significativas, en las concentraciones de resveratrol y sus derivados (µg/g) entre los cultivares inoculados con *L. theobromae* evaluados (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Valores críticos de prueba (valores Test) y probabilidades asociados a la Prueba de significación estadística para la variable: cultivar de vid.

| Compuestos (µg/g) | valor Test | p-value asociado |
|--|------------|------------------|
| Resveratrol total (suma de concentraciones individuales) | 10,55 | 0,0000 *** |
| Trans-resveratrol | 9,22 | 0,0000 *** |
| Cis-resveratrol glicosidado | 13,36 | 0,0000 *** |
| Trans-resveratrol glicosidado | 8,02 | 0,0000 *** |

La Figura 3.8 muestra la distribución de concentraciones de estilbenos medidos a los 21 días post-inoculación en los distintos cultivares de vid.

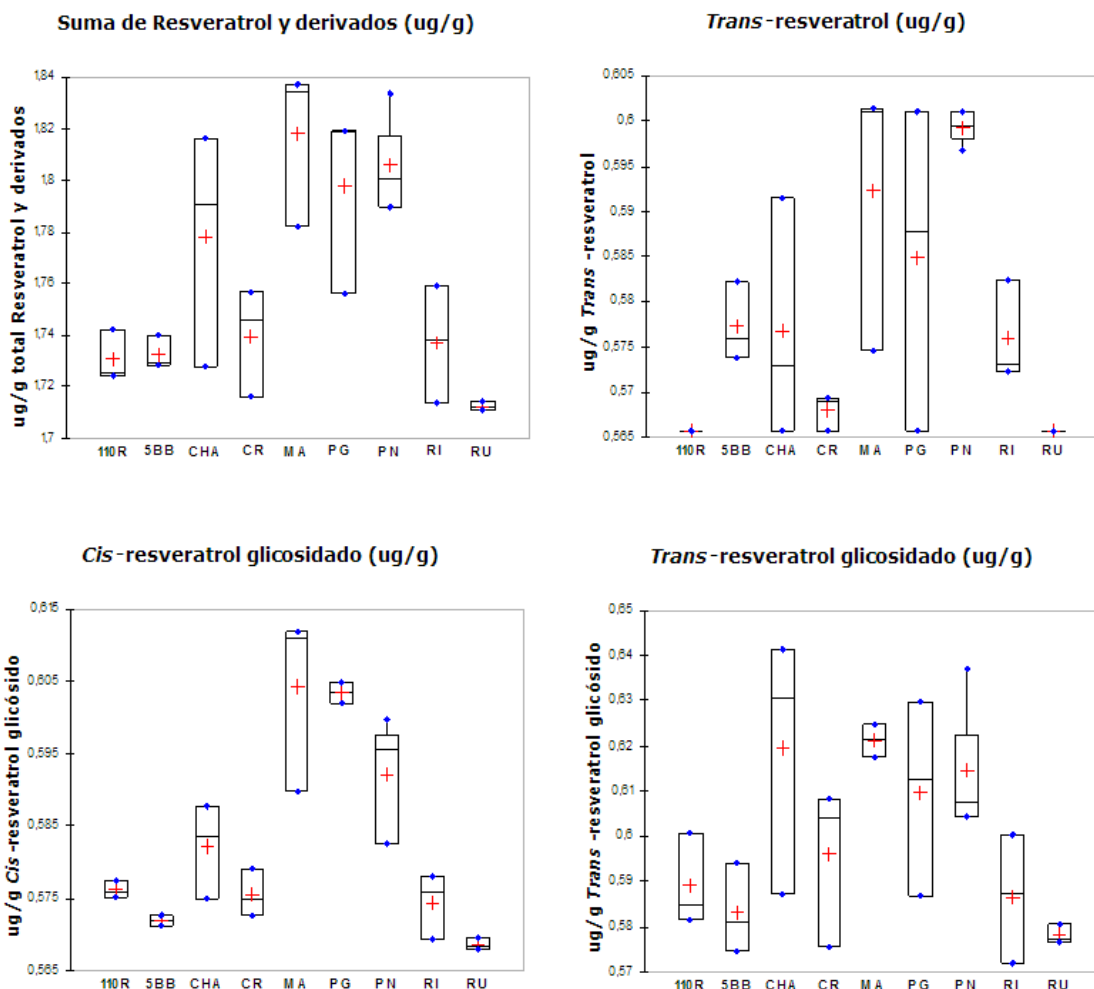


Figura 3.8. Susceptibilidad/Tolerancia de *Vitis* spp. a *L. theobromae*. Diagramas Box plots³ ilustran la distribución de concentraciones de estilbenos en plantas mantenidas en condiciones de invernáculo (n=4 cuatro plantas por repetición) medidos a los 21 días post-inoculación. Se evaluaron los siguientes cultivares: portainjerto 110R, portainjerto 5BB, Chardonnay (CHA), Criolla Chica (CR), Malbec (MA), Pedro Gimenez (PG), Pinot Noir (PN), *Vitis riparia* (RI) y *Vitis rupestris* (RU).

³ La línea sólida y el signo + dentro de la caja corresponden a la mediana y media, respectivamente. Las barras tope de cada caja corresponden a 25 percentil (inferior) y 75 percentil (superior) de los datos. Las barras externas representan los percentiles 10 y 90 y los puntos representan los valores mínimo y máximo (percentiles 5 y 95).

Los cultivares Pinot Noir, Malbec y Pedro Gimenez, inoculados con *L. theobromae*, mostraron mayores contenidos de Trans-resveratrol, Trans-resveratrol glicosidado y Cis-resveratrol glicosidado, con significación estadística. Por otro lado, *V. rupestris*, 5 BB, 110R, Criolla Chica y *V. riparia* presentaron los menores valores, algunos con concentraciones por debajo del límite de detección (Figura 3.8).

En la Tabla 3.7, se muestran los resultados de la caracterización de *Vitis* spp. inoculados con el hongo, con las concentraciones de estilbenos detectados, mostrando las relaciones significativas clasificadas en función de los valores Test. Malbec, se asoció a los valores más altos de concentración de *Trans*-resveratrol glicosidado, *Cis*-resveratrol glicosidado y concentración total de estilbenos. Además con valores altos de resveratrol se asociaron Pinot Noir y Pedro Gimenez. Contrariamente, *Vitis rupestris* se asoció a los valores más bajos de los tres compuestos (valores Test negativos en valor absoluto > 2,58), junto con 110R, 5BB y la cv. Criolla Chica de *Vitis vinifera*.

Tabla 3.7. Concentraciones de *Trans*-resveratrol y derivados *Trans*-resveratrol y *Cis*-resveratrol glicosidados (n=3) obtenidas por HPLC y desvío típico correspondiente. El Valor Test se utilizó como valor crítico de prueba².

| Concentración de <i>Trans</i> -resveratrol (µg/g) | | | Concentración de <i>Trans</i> -resveratrol glicosidado (µg/g) | | | Concentración de <i>Cis</i> -resveratrol glicosidado (µg/g) | | | Concentración Total (µg/g) | | |
|---|------------|---------------|---|------------|---------------|---|------------|---------------|----------------------------|------------|---------------|
| Orden de > a < contenidos | valor Test | X ± σ | Orden de > a < contenidos | valor Test | X ± σ | Orden de > a < contenidos | valor Test | X ± σ | Orden de > a < contenidos | valor Test | X ± σ |
| Pinot Noir | 5,47 | 0,599±0,00*** | Malbec | 3,87 | 0,621±0,00*** | Malbec | 5,69 | 0,604±0,01*** | Malbec | 4,95 | 1,818±0,03*** |
| Malbec | 3,84 | 0,592±0,01*** | Chardonnay | 3,56 | 0,620±0,02*** | Pedro Gimenez | 5,46 | 0,603±0,00*** | Pinot Noir | 3,72 | 1,806±0,02*** |
| Pedro Gimenez | 1,81 | 0,585±0,01* | Pinot Noir | 2,54 | 0,615±0,01** | Pinot Noir | 2,29 | 0,592±0,01** | Pedro Gimenez | 3,21 | 1,798±0,03*** |
| Criolla Chica | -2,79 | 0,568±0,00*** | Pedro Gimenez | 1,79 | 0,610±0,02* | 110R | -1,87 | 0,576±0,00* | Chardonnay | 1,52 | 1,778±0,04* |
| <i>V. rupestris</i> | -3,43 | 0,566±0,00*** | 110R | -1,89 | 0,589±0,00* | Criolla Chica | -2,02 | 0,576±0,00** | Criolla Chica | -1,86 | 1,739±0,02* |
| 110R | -3,43 | 0,566±0,00*** | <i>V. riparia</i> | -2,34 | 0,587±0,00** | <i>V. riparia</i> | -2,33 | 0,574±0,00** | <i>V. riparia</i> | -2,09 | 1,737±0,02** |
| | | | 5BB | -2,94 | 0,583±0,01*** | 5BB | -2,99 | 0,572±0,00*** | 5BB | -2,48 | 1,732±0,01** |
| | | | <i>V. rupestris</i> | -3,85 | 0,578±0,00*** | <i>V. rupestris</i> | -3,88 | 0,569±0,00*** | 110R | -2,62 | 1,731±0,01*** |
| | | | | | | | | | <i>V. rupestris</i> | -4,22 | 1,712±0,00*** |

3.3.3. Análisis de la producción de Resveratrol y sus derivados en vides mantenidas *in vitro* e inoculadas con el hongo *L. theobromae*.

L. theobromae se desarrolló en plantas *in vitro* desde las 24 h e indujo síntomas desde las 48 h y 72 h en forma desigual en ambos cultivares, finalizando con 100 % de plantas muertas a las 96 h (quinto día) post-inoculación en Malbec, frente al 33 % en *Vitis rupestris* (Figura 3.9). Se registraron síntomas en las plantas inoculadas, lo que no ocurrió en las plantas control. Entre las primeras, *V. rupestris* mostró significativamente menor decoloración, muerte de hojas y presencia

de micelio que la cv. Malbec (Tabla 3.8). No se reaisló el hongo de los controles, mientras que el porcentaje de reaislamiento de vides *in vitro* inoculadas con *L. theobromae* fue del 100 %.

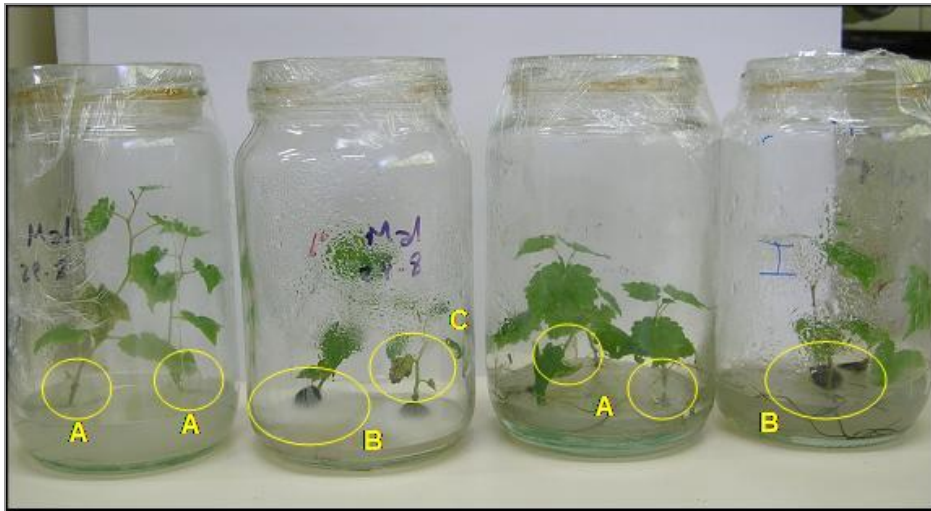


Figura 3.9. Plantas *in vitro* de la cv. Malbec y de *Vitis rupestris*, de 60 días, inoculadas con *L. theobromae* (B) y controles inoculados con micelio APG estéril (A). Primeros síntomas en hoja en el cv. Malbec a las 48 h post-inoculación⁴ (C).

Tabla 3.8. Número de plantas *in vitro* de Malbec y *Vitis rupestris* con síntomas, en plantas inoculadas con *L. theobromae* y controles.

| Tiempo post-inoculación | Tratamiento | Síntomas en parte aérea | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------------------------|------|-------|------|-------|------------------------|------|-------|------|-------|
| | | Malbec | | | | | <i>Vitis rupestris</i> | | | | |
| | | SI | | TOTAL | | | SI | | TOTAL | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | TOTAL | 0 | 1 | 2 | 3 | TOTAL |
| 0 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| 8 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| 24 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 1,00 | 6,00 | 2,00 | 0,00 | 9,00 | 6,00 | 3,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| 48 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 0,00 | 0,00 | 7,00 | 2,00 | 9,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 0,00 | 9,00 |
| 72 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 8,00 | 9,00 | 0,00 | 4,00 | 5,00 | 0,00 | 9,00 |
| 96 h | Control | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 |
| | Inoculado | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,00 | 9,00 | 0,00 | 0,00 | 6,00 | 3,00 | 9,00 |

⁴ Los síntomas fueron evaluados por observación visual a las 8h, 1 día, 2 días, 3 días y 4 días post-inoculación siguiendo la siguiente escala: 0 = hojas verdes sin síntomas; 1 = hoja con necrosis o manchas rojas; 2 = hojas y tallos castaños y 3 = hojas y tallo completamente necróticos (muerto) con presencia de micelio del hongo. Valores resaltados entre filas y columnas = diferencias significativas según Test de chi cuadrado (p<0,001).

Determinación de resveratrol por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC-DAD).

Se analizaron *Trans*-resveratrol, *Trans*-resveratrol glicosidado y *Cis*-resveratrol glicosidado en hoja de Malbec y de *V. rupestris* inoculadas con *L. theobromae* y controles en los tiempos 8, 24, 48 y 72 h post-inoculación.

Es posible que la disminución encontrada en *V. rupestris*, en los niveles de *trans*-resveratrol fuese el resultado de la formación del isómero y glicósidos.

En el 100 % de los controles, para todos los tiempos considerados, no se detectaron estilbenos, en las condiciones del ensayo, por el análisis HPLC, mostrando diferencias significativas respecto las plantas inoculadas con *L. theobromae*, en todos los cultivares testeados (99 % certeza, Prob>F=0,0001).

Los resultados de las pruebas de independencia Chi cuadrado, entre horas de determinación post-inoculación y compuesto estilbénico detectado, para los cultivares Malbec y *V. rupestris*, mostraron diferencias significativas en los compuestos detectados y tiempos evaluados (99 % certeza, Prob>F=0,0001) (Figura 3.10).

A diferencia del Malbec, a las ocho horas de la inoculación, el *Trans*-resveratrol glicosidado y el *Cis*-resveratrol glicosidado se detectaron en mayor concentración en hojas de *V. rupestris* mostrando una acumulación de estilbenos como respuesta precoz a la inoculación del hongo.

Se estima que el *Trans*-resveratrol libre se encontró en menor cantidad debido a su transformación en los otros compuestos derivados. La tendencia de incremento también, se mantuvo a las 24 horas con valores significativamente altos.

En la cv. Malbec, sólo se observó una acumulación significativa de *Trans*-resveratrol y su isómero glicosidado a las 48 h desde la inoculación.

En Malbec, sólo se observó una acumulación significativa (48 h), mientras que en *V. rupestris*, se observaron dos, una a las 24 h y otra a las 72 h, siempre superando significativamente los tenores de estilbenos a los detectados en Malbec (Figura 3.10).

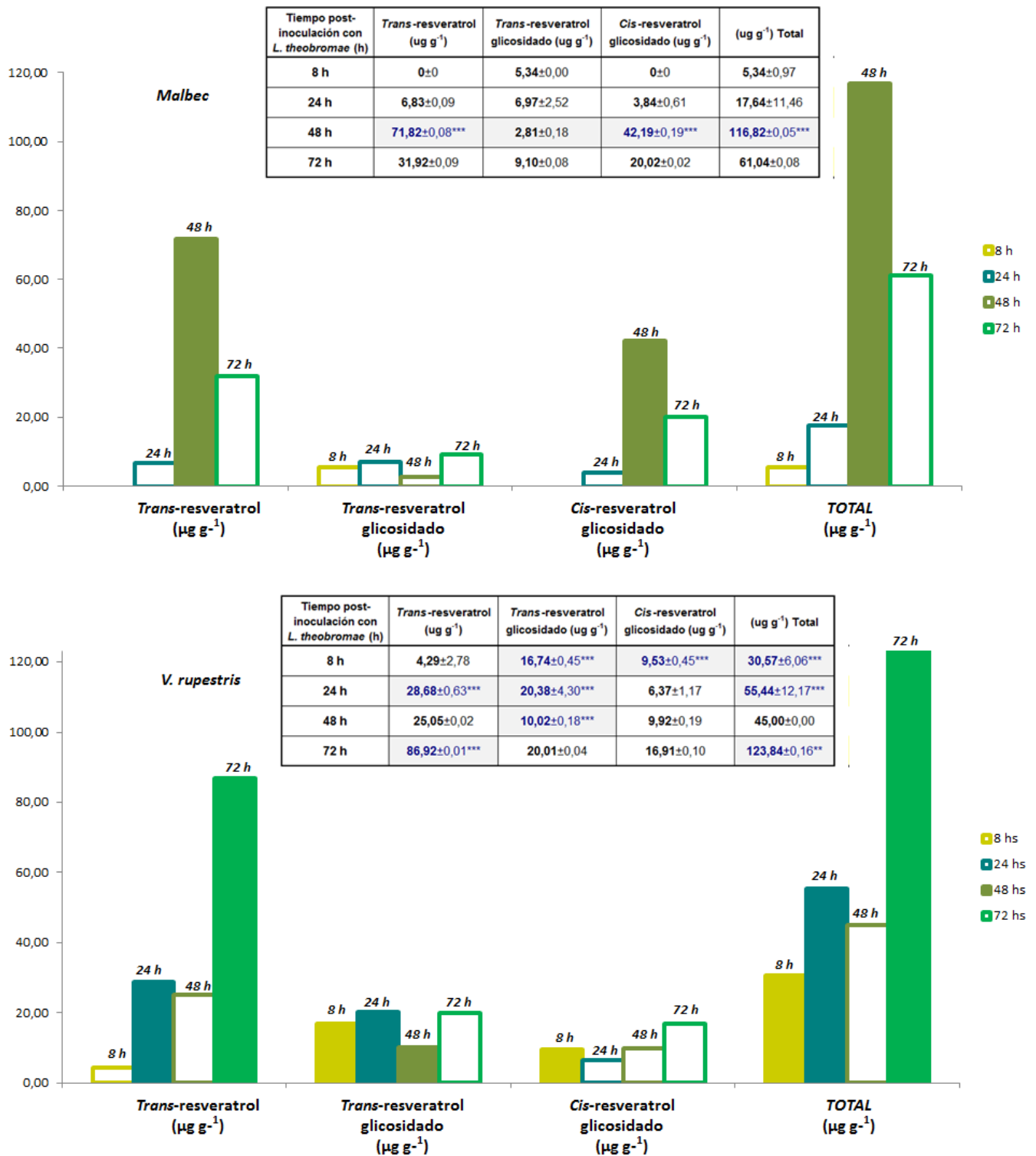


Figura 3.10. Gráficos de barras con las concentraciones medias de *Trans*-resveratrol y derivados glicosidados (n=3) obtenidas a las 8, 24, 48 y 72 h desde la inoculación con *L. theobromae*, por HPLC para las variedades Malbec y *V. rupestris*. Los valores resaltados y barras rellenas, corresponden a valores significativos por la Prueba de Chi cuadrado.

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las dificultades encontradas para obtener material biológico de distintos cultivares de *Vitis*, considerada una especie leñosa, hicieron necesario el objetivo de optimizar protocolos para la obtención de plantas *in vitro* y en condiciones de invernáculo a fin de disponer de una fuente continua de material estéril, independiente de condiciones ambientales y otros factores de cultivo a campo.

El ambiente *in vitro*, con una alta humedad relativa, bajo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno, baja intensidad fotosintética y condiciones de nutrición particulares, induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esa condición. Al transferir las plantas al ambiente *ex vitro*, es indispensable el desarrollo radical *in vitro* óptimo y además, las plantas deben sobrellevar un proceso de “rusticación” para aclimatizarse al nuevo ambiente. La rusticación es una etapa crítica dentro del proceso, en la que se produce la mayor pérdida de plantas. En ella se debe comenzar reduciendo gradualmente la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua.

En el presente trabajo, se obtuvieron resultados promisorios, logrando la producción de un stock de plantas tanto in vitro como en invernáculo, que permitió generar antecedentes y facilitar los estudios de biodefensa a futuro.

Posteriormente, para estudiar las respuestas de defensa de la vid frente a *Botryosphaeriaceae*, se efectuaron dos experimentos distintos. En el primero de ellos, los objetivos fueron identificar y evaluar respuestas de defensa *Vitis* spp. empleando parámetros de crecimiento en condiciones de invernáculo y definir una escala de tolerancia. En el segundo experimento, se evaluó producción de síntomas en plantas inoculadas *in vitro* de *V. rupestris* y de *Malbec*. En ambos ensayos, las vides se hicieron crecer tanto en invernáculo como en cámara de cultivo *in vitro* y se inocularon con *L. theobromae* y agar estéril (controles).

Las plantas de invernáculo inoculadas con micelio estéril (controles) siempre mostraron los mayores contenidos de clorofila, 0% de plantas con síntomas y 0 % de muerte de hojas, además de no desarrollar síntomas en el punto de inoculación. Contrariamente, L. theobromae, no sólo disminuyó los contenidos de clorofila, sino que produjo progresiva deshidratación de hojas, defoliación y muerte de brotes, necrosis y desarrollo de micelio en torno al punto de inoculación.

Estos síntomas en madera y en la parte herbácea de la vid son constatados por otros autores que los describen como característicos de hongos de madera en vid (Aroca y Raposo, 2009; Larignon *et al.*, 2009, 2011; Larignon, 2010; Laveau *et al.*, 2009; Letousey *et al.*, 2010; Rego *et al.*, 2009; Savocchia *et al.*, 2007; Urbez-Torres y Gubler, 2009; Van Niekerk *et al.*, 2004).

Igualmente, la disminución de contenidos de clorofila en plantas inoculadas con el patógeno, estuvo en concordancia con los estudios de Petit *et al.*, (2006) en que la fotosíntesis se ve muy afectada en hojas con síntomas de Esca.

Los cultivares ensayados mostraron significativamente, distinto grado de susceptibilidad en función de mayor mortalidad de plantas, menores contenidos de clorofila, muerte de hojas, brotación post-inoculación, presencia de micelio en torno a la inoculación y avance de lesión, parámetros utilizados anteriormente en vid (Amponsah et al., 2009, 2011; Laveau et al., 2009; Linaldeddu et al., 2010; Phillips, 1998; Van Niekerk et al., 2004). V. rupestris y Criolla Chica fueron los cultivares más tolerantes, a los 21 días desde la inoculación, en contraposición, Malbec fue el cultivar más susceptible mostrando primero el decaimiento de brotes, con un colapso rápido y muerte.

Se demostró el desarrollo de micelio en los cultivares sugeridos como más susceptibles. Esto coincide con antecedentes de *L. theobromae*, la cual es conocida por fructificar sobre tejido muerto de brazos, troncos, restos de poda (Larignon *et al.*, 2010, 2011).

En función de los resultados obtenidos, se estableció un orden de cultivares de menos tolerante a más tolerante, según los parámetros asociados a susceptibilidad: Malbec, Chardonnay, 5BB, Pinot Noir, Pedro Gimenez, 110R, Vitis riparia, Criolla Chica y Vitis rupestris.

La información que existe en la bibliografía, sobre los cultivares ensayados, es escasa. Existen estudios previos de la susceptibilidad de *Vitis* spp en condiciones controladas según síntomas foliares y síntomas en madera (Sosnowsky *et al.*, 2007; Péros *et al.*, 1994; Zanzotto *et al.*, 2008) pero poco se conoce sobre la tolerancia de cepajes característicos de nuestra zona vitícola, a especies de *Botryosphaeriaceae*.

Estudios de Billones-Baaijens *et al.*, (2014) demostraron la susceptibilidad de portainjertos y cultivares utilizados comunmente en Nueva Zelanda, frente a *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. australe*. Los resultados obtenidos mostraron que los portainjertos 5C y SO4 fueron los más susceptibles. Asimismo, las variedades injertadas que se mostraron más susceptibles fueron Merlot, Pinot noir y Chardonnay, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis.

Travadon *et al.*, (2013) confirmaron que el cultivar Thompson Seedless, de uva para mesa, es más susceptible a *Botryosphaeria* spp. comparado con otros cultivares de *V. vinifera*. Además, Urbez-Torres (2009), demostró la susceptibilidad de Chardonnay, y Arias, (2008) la de Cabernet Sauvignon y Semillón frente especies de *Botryosphaeriaceae*. Igualmente, Armengol *et al.*, 2001 también demostraron diferencias en la susceptibilidad a *Botryosphaeria* de cultivares procedentes de Cataluña. Según estudios de Christen *et al.*, 2007; Fussler *et al.*, 2008 y Sosnowski *et al.*, (2007), los cultivares Merlot, Carignan y Grenache, se comportaron como más tolerantes, desarrollando síntomas con menor severidad que los de mayor susceptibilidad como Cabernet Sauvignon, Syrah,

Pinot Noir, Riesling, Ugni blanc, Pulsard y Sauvignon Blanc. Investigaciones de Amponsah *et al.*, (2011), son contradictorias y señalan que no existieron diferencias significativas entre Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Pinot Noir, Riesling y Sauvignon Blanc inoculados con especies de *Botryosphaeriaceae*.

En Vitis rupestris no se produjo decaimiento externo significativo y tampoco se produjo la muerte de ninguna planta inoculada respecto el resto de los cultivares. Las vides americanas son conocidas por su mayor resistencia a enfermedades que vides *V. vinifera*, por lo que se espera que muestren mayor tolerancia a las enfermedades de madera (Malacarne *et al.*, 2011; Travadon *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en este estudio lo confirman.

Vitis spp. presentan diferentes respuestas a la infección de otros patógenos de la vid. *V. rotundifolia* posee tolerancia a Peronóspora, Antracnosis, Podredumbres y Oidio, mientras que *V. vinifera* generalmente son más susceptibles. Yu *et al.*, (2012), establecieron que *Vitis Vinifera* chinas, también poseen alta resistencia a estas enfermedades. Babikova *et al.*, 2008 establecieron una escala de mayor tolerancia a *B. cinerea*, *P. viticola* y *E. necator* (Cabernet Sauvignon, Riesling, Pinot Noir, Pinot Blanc) a menor tolerancia (Albariño, Touriga Nacional, Tempranillo). Boso *et al.*, 2008, establecieron la tolerancia a *P. viticola* de las especies *V. riparia*, *V. rupestris* y *V. amurensis* respecto los cultivares de *V. vinifera*.

Por otra parte, Prodorutti *et al.*, (2009), señalaron que el portainjerto Kober 5BB mostró tolerancia en respuesta a la infección con *Armillaria mellea* y *P. viticola*. Los resultados obtenidos para *Botryosphaeria*, no coinciden en este caso, la respuesta de los portainjertos fue heterogénea pero en general, 5BB presentó mayor susceptibilidad y 110R se comportó más tolerante.

Subsecuentemente, el estudio *in vitro*, se orientó a investigar dos de los nueve cultivares incluidas en el screening preliminar de invernáculo: Malbec (la más susceptible) y *V. rupestris* (la más tolerante).

En los ensayos in vitro, se observó una respuesta diferencial entre Malbec y V. rupestris, frente a Lasiodiplodia. Los resultados demostraron que L. theobromae es capaz de inducir síntomas asociados en plantas in vitro. Se observó menor desarrollo de la parte aérea, hojas necróticas y muerte de tallos invadidos por el micelio del hongo desde las 24 hs post-inoculación hasta la muerte de la planta en 4 días en Malbec y más tarde, en V. rupestris. Estos resultados coinciden con lo obtenido en trabajos de Urbez-Torres y Gubler, (2009).

Los hongos de madera afectan considerablemente la fotosíntesis en hoja, produciendo perturbaciones en el almacenamiento de carbohidratos. Se plantea la hipótesis de que toxinas fúngicas extracelulares segregadas a los vasos de conducción, son transportadas por el flujo transpiratorio y son absorbidas en bajas concentraciones por las hojas y produce los síntomas en hojas y otros órganos (Petit *et al* 2006).

Numerosos trabajos prueban la producción de fitotoxinas por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* (Abdou *et al.*, 2010, Andolfi *et al.*, 2011; Arias, 2008; Rodríguez-Bonilla *et al.*, 2011; Djoukeng *et al.*, 2009; Evidente *et al.*, 2010; Kashima *et al.*, 2009; Martos *et al.*, 2008; Pedras *et al.*, 2011; Rukachaisirikul *et al.*, 2009).

Las diferencias en tolerancia observadas en función de la expresión de síntomas, sugiere la presencia de factores intrínsecos de la vid, responsables de una mejor respuesta defensiva. Una hipótesis es la activación de mecanismos de defensa que conducen a la producción de fitoalexinas. Los estilbenos se consideran el grupo de fitoalexinas más importante sintetizado en la vid y son conocidos por su acción protectora frente a varios patógenos (Capítulo I). Se plantearon entonces nuevos objetivos: poner a punto y desarrollar el método de extracción y de determinación de contenidos de resveratrol en hoja, en plantas en maceta, en condiciones de invernáculo, y establecer una escala de tolerancia considerando todos los parámetros evaluados.

En primer lugar, debido a la diversidad de reportes referidos a los tipos de extractos y condiciones de extracción de compuestos fenólicos, particularmente, estilbenos a partir de hojas de vid, se plantearon las formas de extracción descritas en la sección 3.2.2.a de acuerdo a la mayor frecuencia en la bibliografía.

El método seleccionado para la determinación de estilbenos por Cromatografía de líquidos de alta resolución consistió en: extracción con MeOH, pH=7; durante 10 min, en baño refrigerado (0 °C) y con ultrasonido en coincidencia con los trabajos de Cho *et al.*, 2006 y Schoedl *et al.*, 2011.

Los resultados mostraron que tanto el extractante como el método afectaron la obtención de resveratrol. Resultados previos similares que utilizaron MeOH como solvente, presentaron Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Jeandet *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2009 y Poutaraud *et al.*, 2011). La aplicación de ultrasonido a temperaturas bajas, fue más efectiva que el método convencional (agitación, a 60 °C) y coincidió con los estudios de Cho *et al.*, 2006 que informaron un incremento de 24-30 % los contenidos de resveratrol con la aplicación de estas variables. La mayor efectividad obtenida utilizando ultrasonido, también fue reportada por Martin *et al.*, (2009); Schoedl *et al.*, (2011) y Vergara *et al.*, (2012).

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que altas temperaturas y mayores tiempos de extracción que los óptimos, inciden negativamente en la extracción de acuerdo con lo demostrado por Bruno y Sparapano, (2006, 2007), Cho *et al.*, (2006) y Romero-Perez, (2001). Iguales resultados fueron obtenidos por Lopez-Nicolas y García-Carmona, (2008) que además, establecieron que no existe correlación con el pH.

El estilbeno más estudiado en vid, es el *trans*-resveratrol (Delaunay *et al.* 2002; Jean-Denis, 2006; Langcake y Pryce, 1976; Pussä *et al.*, 2006). La determinación de resveratrol por HPLC se utilizó entonces, para evaluar la existencia de diferencias entre los perfiles de resveratrol,

en plantas control y en plantas inoculadas con *L. theobromae*, tanto en el ensayo de plantas en invernáculo como así también, el segundo ensayo de Malbec y *Vitis rupestris* mantenidos *in vitro*, obteniendo resultados que sugieren su pertinente utilización como indicador de tolerancia.

Las diferencias significativas entre plantas inoculadas y plantas control, confirmaron la inducción de Trans-resveratrol, Trans-resveratrol glicosidado y Cis-resveratrol glicosidado frente al ataque del hongo. Esto coincidió con lo reportado por Almafitano *et al.*, (2000, 2011); Lambert, (2012); Letousey *et al.*, (2010); Martin *et al.*, (2009); Mazullo *et al.*, 2000 y Santos *et al.*, (2006), que describieron el aumento de producción *in vivo* de compuestos de la vid frente a hongos de madera. Al respecto, la bibliografía es muy reducida en el tema.

Se reportan, en la mayor cantidad de trabajos, el resveratrol y derivados en hojas de vid frente a *Peronóspora* (Bellow *et al.*, 2013; Boubakri *et al.*, 2013; Godart *et al.*, 2009; Jean-Denis, 2006; Kortekamp *et al.*, 2006; Keskin *et al.*, 2008, 2009; Latouche *et al.*, 2013; Mattivi *et al.*, 2011; Pussa *et al.*, 2006; Triska *et al.*, 2012; Van Leeuwen *et al.*, 2013) y otras enfermedades que afectan a la vid (Bavaresco *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2012; Godart *et al.*, 2009; Mattivi *et al.*, 2011; Pussa *et al.*, 2006; Timperio *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos son bien conocidos como compuestos antifúngicos y antibacterianos en plantas. Estudios de Lambert *et al.*, (2013) demostraron que *Botryosphaeriaceae* constituyen una familia particularmente sensible al efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos. El efecto inhibitorio de resveratrol y derivados, sobre agentes patógenos causantes de enfermedades de madera en vid ha sido expuesto por numerosos autores (Bruno y Sparapano 2006, 2007; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001; Del Rio *et al.* 2004; Jeandet *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013; Mugnai *et al.*, 1997, 1999; Mazullo *et al.*, 2000; Santos *et al.* 2006 Schoedl *et al.*, 2012). Asimismo, para otras enfermedades de la vid, como *Peronóspora* (Jeandet *et al.* 2002; Montero *et al.*, 2003; Pezet *et al.*, 2004a,b).

El dosaje de trans-resveratrol y sus derivados determinó que los contenidos de estilbenos variaron de forma significativa en función del cultivar de vid. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el Malbec, se asoció a los valores más altos de concentración de Trans-resveratrol glicosidado, Cis-resveratrol glicosidado y concentración total de estilbenos. Además con valores altos de resveratrol se asociaron Pinot Noir y Pedro Gimenez. Contrariamente, Vitis rupestris se asoció a los valores más bajos de los tres compuestos junto con 110R, 5BB y el cv. Criolla Chica de Vitis Vinifera. Se establecieron discrepancias entonces, respecto a numerosos estudios que demuestran los incrementos de contenidos de resveratrol en plantas tolerantes (Godart *et al.*, 2009; Goncalvez *et al.*, 2011; Ham *et al.*, 2010; Jean-Denis *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2006; Pezet *et al.*, 2004a,b; Zamboni *et al.*, 2006).

La hipótesis que surgió para explicar la ausencia de estilbenos a los 21 días post-inoculación, en los cepajes que resultaron tolerantes según la escala de parámetros de crecimiento,

fue que los cultivares tolerantes, tienen la capacidad de activar los mecanismos de defensa más rápidamente y/o intensamente. La evaluación a los 21 días de *V. rupestris* no detectó compuestos fenólicos porque estos se generaron y actuaron antes de ese período, como respuesta de defensa.

Dai *et al.*, (1995) y Figueiredo *et al.*, (2008) observaron que ante la acumulación de compuestos fenólicos en hojas enfermas con esca, de Alvarinho, la planta no pudo evitar o minimizar el desarrollo de síntomas o signos. Esto se explicó por la activación de las respuestas defensivas mucho más tarde. Esto sugiere que tanto cultivares tolerantes como susceptibles, tienen el mismo patrimonio genético y son capaces de activar los mismos mecanismos de tolerancia, sin embargo, los cultivares susceptibles muestran tener una activación más lenta de estos mecanismos, mientras que los cultivares tolerantes activan mecanismos de defensa rápidamente y más intensamente frente al reconocimiento del patógeno. (Dai *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 2008; Letousey *et al.*, 2010 ; Magnin-Robert *et al.*, 2011; Malacarne *et al.*, 2011).

La producción de compuestos de defensa indica una inducción o aumento de la tolerancia y cuando la expresión es más elevada y durable en el tiempo, mayor es la tolerancia del cultivar (Kortekamp *et al.*, 2006; Sbagui *et al.*, 1996).

Para testear la nueva hipótesis planteada, surgió la necesidad y objetivo de estudiar en el sistema *in vitro* la cinética de producción de resveratrol en un cultivar susceptible y uno tolerante, a las 8 h, 24 h, 48 h desde la inoculación con *L. theobromae*.

En efecto, aparecieron síntomas foliares correlacionados con la menor tolerancia al patógeno. Los resultados in vitro mostraron contrariamente a las pruebas en invernáculo, que la acumulación de contenidos de trans-resveratrol, trans-resveratrol glicosidado y cis-resveratrol glicosidado, fue más intensa y más rápida en Vitis rupestris, respecto de Malbec, el cultivar que resultó más susceptible a L. theobromae. En plantas inoculadas de V. rupestris se detectaron los compuestos mencionados significativamente, a las ocho horas posteriores a la inoculación, mostrando una acumulación de estilbenos como respuesta precoz a la inoculación del hongo. Esta tendencia se mantuvo a las 24 h y se detectó una segunda acumulación significativa de trans-resveratrol a las 72 h, siempre superando los tenores de estilbenos a los detectados en Malbec, en la cual sólo se confirmó una acumulación significativa de Trans-resveratrol y su isómero glicosidado a las 48 h desde la inoculación.

Patrones semejantes de acumulación de estilbenos, fueron obtenidos en vides en maceta por Lambert, (2012) quién estableció que cultivares susceptibles a la Esca, como Cabernet Sauvignon presentaron bajos contenidos con una sola acumulación de resveratrol a las 18 h post-elicitación, mientras que los cultivares tolerantes, Merlot y Carignan, mostraron un pico de trans-resveratrol a las 12 h y su derivado glicosidado a las 18 h.

Resultados similares obtuvieron Lambert *et al.*, (2013), describiendo que los cvs. tolerantes Merlot y Carignan responden a hongos de la Esca de forma más rápida e intensa estimulando

acumulación de estilbenos y sobreexpresión de genes asociados a PAL y STS. Estos autores, señalaron que los niveles de trans-resveratrol, se incrementaron significativamente después de las 3 h en todos los cvs. evaluados. En el tolerante, llegaron a las 12 h y se mantuvieron estables hasta las 18 h (meseta) y luego disminuyeron a las 24 h a la línea base. En los susceptibles, se acumuló el trans-resveratrol en bajas cantidades y se incrementó entre las 12 h y 18 h. Douillet-Breuil *et al.* (1999) corroboraron también, la producción de trans-resveratrol, entre las 24 h a 48 h después de la elicitación en las cvs. *Vitis rupestris* y *Vitis vinifera* cv. Mourvèdre. Por otro lado, Schnee *et al.*, (2008) también detectaron respuestas de defensa en vides afectadas con *E. necator* entre 24 h y 48 h después de la inoculación y Sbagui *et al.* (1995) establecieron en plantas *in vitro*, la correlación entre el contenido de resveratrol y el nivel de resistencia a la podredumbre gris de los racimos. Pezet *et al.*, (2004a,b) confirmaron que a 48 h después de la inoculación con *P. viticola*, se detectó resveratrol, en altas concentraciones, en los cultivares tolerantes evaluados. Los resultados difieren de lo obtenido por elicitación con UV por Borie *et al.*, (2004) que establecieron que un cultivar de vid tolerante (*Vitis rupestris*) presentó un nivel de expresión de estilbenos constante y una acumulación de un pico simple. Los cultivares menos tolerantes (Pinot Noir y Chardonnay de *Vitis vinifera*), presentaron dos picos de acumulación de estilbeno.

Macedo Basto Goncalves, (2011), establecieron los patrones de acumulación de estilbenos en distintos cultivares: En Chardonnay, se incrementó la producción hasta las 24 h de piceidos con un pico a las 24 h; en Solaris, Pinot Noir, Sangiovese, Cabernet Sauvignon, se inició la acumulación de estilbenos desde las 72 h; y en Muller-Thurgau, en hojas jóvenes detectaron a las 12 h y 72 h sendos picos de acumulación de estilbenos. En el presente trabajo, sólo se evaluaron el resveratrol y sus derivados isómeros y glicósidos y experimentalmente no fue posible la determinación de piceidos o viniferinas, con diferente tiempo de retención, por lo que podría ser la causa de que los tiempos obtenidos no concuerden con los citados por la bibliografía existente.

Con los cultivares evaluados en esta tesis, se deberían llevar a cabo futuras investigaciones sobre la expresión de genes relacionada con una respuesta más fuerte y rápida en los cepajes tolerantes que en los cepajes susceptibles. Esto fue estudiado por Letousey *et al.*, (2010) y Magnin-Robert *et al.*, (2011) quienes establecieron una inducción de genes (PAL y STS) en hojas enfermas con Esca correlacionada con la acumulación de estilbenos. Steimez *et al.* (2012) también obtuvieron iguales resultados en vid frente a *B. cinerea*. Asimismo, Adrian *et al.*, 2000, establecieron que la mRNA de STS, puede detectarse a las 4 h posteriores a la elicitación de plantas con UV.

A pesar de la alta acumulación de estilbenos en hojas de Malbec afectadas con *L. theobromae*, en el ensayo de invernáculo, las plantas no pudieron evitar la aparición de síntomas y muerte de brote. Según la hipótesis confirmada por los resultados *in vitro*, esto podría deberse a la activación de las defensas mucho más tarde (confirmando la susceptibilidad de este cultivar).

Estudios de Keller *et al.*, (2003) y Magee *et al.*, (2002) en vides frente al hongo *Botrytis cinerea*, fueron contrapuestos a lo descrito hasta ahora y no validan la relación entre la acumulación de resveratrol y la incidencia de *B. cinerea* en vid.

Esto se apoya en la hipótesis de la capacidad del patógeno de activar mecanismos de detoxificación enzimática del resveratrol por la acción de la enzima laccasa (Adrian *et al.*, 1998; Andolfi *et al.*, 2011; Rodríguez-Bonilla *et al.*, 2011; Breuil *et al.*, 1999; Pedras *et al.*, 2011; Pezet *et al.*, 2003; Sbaghi *et al.*, 1996). Se desprende entonces, otra hipótesis a verificar: la estimulación de reacciones de defensa frente a hongos de madera están potencialmente ligadas a las toxinas fúngicas. Estudios previos de Andolfi *et al.*, (2011) y Bruno y Sparapano, (2007) validan esta hipótesis y explican la susceptibilidad de la vid a hongos de madera. Asimismo, existen reportes de toxinas producidas por *Botryosphaeriaceae* (Arias, 2008; Messias *et al.*, 2009).

Se concluye que las cuatro hipótesis planteadas se cumplieron. Se establecieron vides in vitro y en invernáculo exitosamente. Se demostró que la vid tiene un sistema de defensa, por el cual aumenta la concentración de resveratrol frente al patógeno, en invernáculo e in vitro y asimismo, existen diferencias de tolerancia/susceptibilidad varietal de la vid frente a hongos de madera. Los resultados demostraron que las respuestas de defensa del cultivar tolerante (Vitis rupestris) es más intensa y precoz que aquel susceptible (Malbec) por inoculación artificial con L. theobromae. Asimismo, se deduce que el modelo in vitro es importante de tener en cuenta para evaluar respuestas de defensa de la vid en tiempos más cortos y de forma más específica.

A pesar de la importancia que tiene conocer la susceptibilidad de los diferentes cultivares de Vitis, existe una notable falta de información al respecto. Conocer la susceptibilidad varietal permitirá hacer un seguimiento a campo especial de los viñedos. Los resultados obtenidos constituyen un avance en la caracterización de algunos cultivares pero es necesario realizar un estudio de campo que evalúe la susceptibilidad y tolerancia de vides adultas a las distintas especies de Botryosphaeriaceae encontradas en nuestro país.

Estos resultados son esenciales para estudiar y comprender los mecanismos de defensa involucrados y plantear a futuro, estrategias de mejoramiento sanitario y genético que podrán ser integradas al sistema de protección de la vid. Sin un fungicida eficaz para el control de enfermedades de madera, sería conveniente una selección previa de cultivares que ofrezcan cierta tolerancia a hongos de madera y catalogar las más susceptibles.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDOU R; SCHERLACH K; DAHSE H (2010). Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*[J]. *Phytochemistry*, 71(1): 110-116.
- ADRIAN M; RAJAEI H; JEANDET P; VENEAU J; BESSIS R (1998). Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88(5): 472-4776.
- ADRIAN M ; JEANDET P; DOUILLET-BREUIL AC; TESSON L; BESSIS R (2000). Stilbene content of mature *Vitis Vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6103-6105.
- ADRIAN M; JEANDET P (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83: 1345-1350.
- AGATI AG; ZORAN G; CEROVIC B; DALLA MARTA C; DI STEFANO VC; PINELLI PD; TRAVERSI MLE; ORLANDINI SC (2008). Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. *Functional Plant Biology* 35: 77-84.
- AGATI G; BRUNETTI C; DI FERDINANDO M; FERRINI F; POLLASTRI S; TATTINI M (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 35-45.
- AGGARWAL, B.; BHARDWAY, A.; AGGARWAL, RS, SEERAM NP, SHISHODIA S, TAKADA Y (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 24: 2783-2840.
- AGRIOS GN (1996). Fitopatología. 3. ed., Editorial Uteha, Limusa, México, pp838.
- AHUJA (2012). Phytoalexins in *Vitaceae*. PMN, http://www.plantcyc.org/tools/tools_overview.faces; accessed November 20, 2011).
- AHUJA I; KISSEN R; BONES AM (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17(2): 73-90.
- ALI K; MALTESE F; CHOI YH; VERPOORTE R (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* 9: 357-378.
- ALMAFITANO C, EVIDENTE A, SURICO G, TEGLI S, BERTELLI E, MUGNAI L (2000). Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 39:178-183.
- ALMAFITANO C; AGRELLI D; ARRIGO A; MUGNAI L; SURICO G; EVIDENTE A (2011). Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis Vinifera* cv. Sangiovese affected by Esca proper. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S224-S235.
- ALONSO-VILLAVERDE V; VOINESCO F; VIRET O; SPRING J-L; GINDRO K (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 265-274.
- AMANCIO S; REBORDAO JP; CHAVES MM (1999). Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 31-37.
- AMICO V; BARRESI V; CHILLEMI R; CONDORELLI D; SCIUTO S; SPATAFORA C; TRINGALI C (2009). Bioassay-guided isolation of antiproliferative compounds from grape (*Vitis vinifera*) stems. *Natural Product Communications* 4: 27-34.
- AMPONSAH NT; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2009). First report of *Neofusicoccum australe* (*Botryosphaeria australis*), a cause of grapevine dieback in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 6-8.

- AMPONSAH NT; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2011). Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of species of the *Botryosphaeriaceae* associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 131: 467-482.
- ANASTASIADI M; PRATSINIS H; KLETSAS D; SKALTSOUNIS A-L; HAROUTOUNIAN SA (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *LWT- Food Science and Technology* 48: 316-322.
- ANDOLFI A; MUGNAI L; LUQUE J; SURICO G; CIMMINO A; EVIDENTE A (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3: 1569-1605.
- ARIAS SM (2008). El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*. Tesis doctorado en Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Barcelona, 234p.
- ARMENGOL J; VICENT A; TORNÉ L; GARCÍA-FIGUERES F; GARCÍA-JIMÉNEZ J (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 325-329.
- AROCA A; RAPOSO R (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. *Journal of Phytopathology* 157: 413-419.
- BÀBÍKOVÁ P; VRCHOTOVÁ N; TRÍSKA J; KYSELÁKOVÁ M (2008). Content of *Trans*-resveratrol in leaves and berries of interspecific grapevine (*Vitis* sp.) varieties. *Czech Journal of food sciences* 26: S13-S17.
- BACCARI C; LINDOW SE (2011). Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology* 101 (1): 77-84.
- BASKARATHEVAN J; JASPERS MV; JONES EE; RIDGWAY HJ (2010). Use of endogenous molecular markers to measure rain water splash dispersal of *Neofusicoccum* species in the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 107.
- BAVARESCO L; FREGONI M; TREVISAN M; MATTIVI F; VRHROUSEK U; FALCHETTI R (2002). The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis* 41: 133- 136.
- BAVARESCO L; PEZZUTTO S; GATTI M; MATTIVI F (2007). Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. *Vitis* 46: 57-61.
- BAVARESCO L; FREGONI C; MACEDO BASTO GONCALVES M; VEZZULLI S (2009). Physiology & molecular biology of grapevine stilbenes: an update. *Grapevine molecular Physiology and Biotechnology* 341-364.
- BECKER L; POUTARAUD A; HAMMA G; MULLER J-M; MERDINOGLU D; CARRÉ V; CHAIMBAULT P (2013). Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* 795: 44-51.
- BEGOUDE BAD; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ; ROUX J (2010). *Botryosphaeriaceae* associated with *Terminalia Catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress* 9: 101-123.
- BEJAN C; VISOIU E (2011). Resveratrol biosynthesis of *in vitro* culture conditions in grapevine (cv. Feteasca Neagra and Cabernet Sauvignon) under the action of AlCl₃ as elicitor agent. *AC Romanian Biotechnological Letters* 16(6): 97-101.
- BELCHÌ-NAVARRO S; ALMAGRO L; LIJAVETZKY D; BRU R; PEDREÑO MA (2011). Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis Vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Reporter* 31(1): 81-89.
- BELCHI-NAVARRO S; ALMAGRO L; SABATER-JARA AB; FERNÁNDEZ-PÉREZ F, BRU R; PEDREÑO MA (2013). Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* 62: 107-110.

- BELHADJ A; TELEF N; CLUZET S; BOUSCAUT J; CORIO-COSTET MF; MÉRILLON JM (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(14): 5781–5787.
- BELLOW S (2012). Etude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou. Tesis Université Paris-Sud – UFR des Sciences, France.
- BELLOW S; LATOUCHE G; BROWN SC; POUTARAUD A; CEROVIC ZG (2013). *In vivo* localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Journal of Experimental Botany* 63(10): 3697-3708.
- BIHON W; SLIPPERS B; BURGESS T; WINGFIELD MJ; WINGFIELD BD (2010). *Diplodia scrobiculata* founet in the Southern hemisphere. *Forest Pathology* 41(320): 175-181.
- BILLONES-BAAIJENS R; JONES EE; RIDGWAY HJ; JASPERS MV (2014). Susceptibility of common rootstock and scion varieties of grapevines to *Botryosphaeriaceae* species. *Australasian Plant Pathology* 43: 25-31.
- BINDON K; MYBURGH P; OBERHOLSTER A; ROUX K; DU TOIT C (2011). Response of grape and wine phenolic composition in *Vitis Vinifera* L cv. Merlot to variation in grapevine water status. *South African Journal of Enologie and Viticulture* 32(1):
- BISSON J; POUPARD P; PAWLUS AD; PONS A; DARRIET P; MÉRILLON J-M; WAFFO-TÉGUO P (2011). Developmente of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 6079-6084.
- BORIE B; JEANDET P; PARIZE A; BESSIS R; ADRIAN M (2004). Resveratrol and Stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture* 5(1): 60-64.
- BOSO S; KASSEMMEYER HH (2008). Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47(1): 39-49.
- BOUBAKRI H; WAHAB MA; CHONG J, BERTSCH C; MLIKI A; SOUSTRE-GACOUGNOLLE I (2012). Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defences responses, including HR like-cell death. *Plant Physiology and biochemistry* 57: 120-133.
- BOUBAKRI H; CHONG J; POUTARAUD A; SCHMITT C; BERTSCH C; MLIKI A; MASSON JE; SOUSTRE-GACOUGNOLLE I (2013). Riboflavin (Vitamin B2) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 136:837–855.
- BOUDET A-M (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722–2735.
- BOUTEGRABET L; FEKETE A; HERTKORN N; PAPASTAMOULIS X; WAFFO-TEGUO P; MERILLON JM; JEANDET P; GOURGEON RD (2011). Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401: 1513-1521.
- BOUTHERIN D; BRON G (1994). Multiplication de plantas hortícolas. Primera Edición, Zaragoza, Acribia. 225p.
- BREUIL A-C; JEANDET P; ADRIAN M; CHOPIN G; PIRIO N; MEUNIER P; BESSIS R (1999). Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89: 298–302.
- BRUNO G; SPARAPANO L (2006). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis Vinifera* L.: II.Characterization of biomolecules in xylem sap andleaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 195–208.

- BRUNO G; SPARAPANO L (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis Vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 210–229.
- BUIARELLI F; COCCIOLI F; JASIONOWSKA R; MEROLLE M; TERRACCIANO A (2007). Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 2955-2964.
- BUSTOS AS; CALISAYA JC; PAREDES C; DURÀN G; TAQUICHIRI M; ALVARADO JÁ; PEÀRRIETA M (2012). Cuantificación de resveratrol en vinos mediante HPLC. *Revista Boliviana de Química* 29(2): 161-166.
- CAI L; HYDE KD; TAYLOR PWJ; WEIR BS; WALLER J; ABANG MM; ZHANG JZ; YANG YL; PHOULIVONG S; ZY L; PRIHASTUTI H; SHIVAS RG; McKENZIE EHC; JOHNSTON PR (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.
- CAI Z; KNORRA D; SMETANSKA I (2012). Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis Vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology* 50: 29– 34.
- CAMPS C; KAPPEL C; LECOMTE P; LÉON C; GOMÉS E; COUTOS-THÉVENOT P; DELROT S (2010). A transcriptomic study of grapevine (*Vitis Vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of experimental botany* 61(6): 1719.
- CALA M; VÁSQUEZ A; GARCIA A; MARTÍNEZ JR; STASHENKO E (2011). Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 35(136): 371-379.
- CARIDI D; TRENERRY VC; ROCHFORT S; DUONG S; LAUGHER D; JONES R (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 105: 691-699.
- CARUSO F; TANSKI J; VILLEGAS-ESTRADA A; ROSSI M (2004). Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and Crystal and molecular structure. *J. Agric. Food Chem* 52: 7279-7285.
- CÉSARI C (2004). Estudios preliminares sobre el efecto de Metil jasmonato y Ácido salicílico en el comportamiento *in vitro* de *Cabernet Sauvignon* en presencia de *Inocutis jamaicensis*. Magister Scientiae en Viticultura y Enología, Facultad de Ciencias Agrarias, U. N. CUYO, Mendoza.
- CETIN ES; ALTINOZ D; TARCAN E; BAYDAR NG (2011). Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products* 34: 994-998.
- CHEN YL; BRUNDRETT MC; DELL B (2000). Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *New Phytologist* 146: 545-556.
- CHEN SF, PAVLIC D, ROUX J; SLIPPERS B; XIE YJ; WINFIELD MJ; ZHOU XD (2011). Characterization of *Botryosphaeriaceae* from plantation grown *Eucalyptus* species in South China. *Plant Pathology* 60 (4): 739-751.
- CHIOU W; SHEN C; CHEN C; LIN C; HUANG Y (2009). Oligostilbenes from the roots of *Vitis thunbergii*. *Planta Medica* 75; 856-859.
- CHO Y-J; HONG J-H; CHUN HS; LEE SK; MIN H-Y (2006). Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering* 77: 725-730.
- CHONG J; POUTARAUD A; HUGUENEY P (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177: 143-155.
- CHRISTEN D; SCHONMANN S; JERMINI M; STRASSER RJ; DÉFAGO G (2007). Characterisation and early detection of grapevine (*Vitis Vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll

- fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 60: 504-514.
- COMMUN, K.; MAURO, M-C.; CHUPEAU, Y.; BOULAY, M.; BURRUS, M.; JEANDET, P. 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 317-323.
 - COUTOS-THÉVENOT P; POINSSOT B; BONOMELLI A; YEAN H; BRED A; BUFFARD D; ESNAULT R; HAIN R; BOULAY M (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany* 52(358): 901-910.
 - DAI GH; ANDARY C; MONDOLOT-COSSON L; BOUBALS D (1995). Histochemical responses of leaves *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 85(2): 149-154.
 - DAI R; GE H; HOWARD S; QIU W (2012). Transcriptional expression of stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet sauvignon grapevine plant. *Science* 197: 70-76.
 - DAMM U, CROUS PW, FOURIE PH (2007). *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia Africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99(5): 664-680.
 - DANI C; OLIBONI LS; AGOSTINI F; FUNCHAL C; SERAFINI L; HENRIQUES JA; SALVADOR M (2010). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro* 24: 148-153.
 - DANIELSSON M; LUNDÉN K; ELFSTRAND M; HU J; ZHAO T; ARNERUP J; IHRMARK K; SWEDJEMARK G; BORG-KARLSON A-K; STENLID J (2011). Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. Infection. *BMC Plant Biology* 11: 154.
 - DEL RÍO JA; GONZALEZ A; FUSTER MD; BOTIA JM; GOMEZ P; FRIAS V; ORTUÑO A (2001). Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S394-S399.
 - DEL RÍO JA; GOMEZ P; BÁIDEZ A; FUSTER MD; ORTUÑO A; FRIAS V (2004). Phenolic compounds have a role in the defense mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 87-94.
 - DELAUNAY JC; CASTAGNINNO C; CHÈZE C; VERCAUTEREN J (2002). Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis Vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 964: 123-128.
 - DELAUNOIS B; FARACE G; JEANDET P; CLÉMENT C ; BAILLIEUL F ; DOREY S ; CORDELIER S (2013). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine?. Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-013-1841-4.
 - DELGADO DE LA TORRE P; PRIEGO-CAPOTE F; LUQUE DE CASTRO MD (2012). Evaluation of the composition of vine shoots and oak chips for oenological purposes by superheated liquid extraction and High Resolution Liquid Chromatography – time off- flight/Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3409-3417.
 - DELOIRE A; KRAEVA E; DAI G-H; RENAULT A-S; ROCHARD J; CHATELAIN C; CARBONNEAU A; ANDARY C (1998). Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. *Phytoma* 510: 46-51.
 - DIXON RA; PAIVA NL (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
 - DIXON RA; PASINETTI GM (2010). Flavonoids and Isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology* 154: 453-457.

- DJOUKENG JD; POLLI S; LARIGNON P; ABOU-MANSOUR E (2009). Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 124: 303-308.
- DONNEZ D; KIMB K-H; ANTOINE S; CONREUX A; DE LUCA V; JEANDET P; CLEMENT C; COUROTA E (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry* 46: 1056-1062.
- DOUILLET-BREUIL, A.C.; JEANDET, P.; ADRIAN, M.; BESSIS, R. 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4456-4461.
- DUBROVINA AS; KISELEV KV; VESELOVA MV; ISAEVA GA; FEDOREYEV SA; ZHURAVLEV YN (2009). Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression. *Journal of Plant Physiology* 166: 1194-1206.
- DUFOUR M-C; CORIO-COSTET M-F (2013). Variability in the sensitivity of biotrophic grapevine pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates. *European Journal of Plant Pathology* 136: 247-259.
- ESCORIAZA, MG. 2012. Estudio de los mecanismos de defensa de la vid frente al ataque de *Phaeoacremonium parasiticum*, hongo asociado a las enfermedades de madera de la vid (*Vitis Vinifera* L.). TESIS Programa de Posgrado en Biología, PROBIOL, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- EVIDENTE A; PUNZO B; ANDOLFI A; CIMMINO A; MELCK D; LUQUE J (2010). Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 74-79.
- FANZONE ML; PEÑA-NEIRA A; JOFRÉ V; ASSOF M; ZAMORA F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2388-2397.
- FANZONE M; ZAMORA F; JOFRÉ V; ASSOF M, GÓMEZ-CORDOVÉS C; PEÑA-NEIRA A (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(3): 704-708.
- FANZONE ML (2012). Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis Vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. Tesis doctoral Universitat Rovira I Virgili, Tarragona. Depósito Legal: T-727-2012.
- FARGHALI H; KUTINOVÁCANOVÁ N; LEKIĆ N (2013). Resveratrol and related compounds as antioxidants with a allosteric mechanism of action in epigenetic drugs targets. *Physiological Research* 62: 1-13.
- FAULIN ABC (2010). Análisis de polifenoles en vinos mediante técnicas de separación. Tesis Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya, Volum IV PFC1, Barcelona, 70pp.
- FAVARON F; LUCCHETTA M; ODORIZZI S; PAIS DA CUNHA AT; SELLA L (2009). The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR proteins. *Journal of Plant Pathology* 91(3): 579-588.
- FERRER JL; AUSTIN MB; STEWART C; NOEL JP (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology Biochem* 46(3): 356-370.
- FERRI M; RIGHETTI L; TASSONI A (2011). Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology* 168: 189-195.
- FIGUEIREDO A; FORTES AM; FERREIRA S; SEBASTIANA M; CHOI YH; SOUSA L; ACIOLL-SANTOS B; PESSOA F; VERPOORT R; PAIS MS (2008). Transcriptional and metabolic profiling

- of grape (*Vitis Vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany* 59, 3371–3381.
- FILA G, GHASHGHAIE J, HOARAU J; CORNIC G (1998). Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum* 102 (3): 411-418.
 - FREMONT L (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* 66(8): 663-673.
 - FUSSLER L; KOBES N; BERTRAND F; MAUMY M; GROSMAN J; SAVARY S (2008). A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the national grapevine wood diseases survey. *Phytopathology* 98: 571-579.
 - GALZY R (1964). Technique de thermothérapie des virus de la vigne. *Annales des Epiphyties* 15: 245-246.
 - GALZY R; HAFFNER V; COMPAN D (1990). Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. *Journal of Experimental Botany* 41(224): 295-301.
 - GAMM M; HÉLOIR M-C; KELLONIEMI J; POINSSOT B; WENDEHENNE D; ADRIAN M (2011). Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis. *Molecular Genetics Genomics* 285: 273-285.
 - GATICA M; DUBOS B; LARIGNON P (2000a). The “hoja de malvón” grape disease in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 41-45.
 - GATICA M; CESARI C; PICCOLO R (2000b). Distribución espacial e incidencia de la enfermedad “hoja de malvón” en viñedos de Mendoza, Argentina. *Horticultura Argentina* 19(46).
 - GATICA M; CÉSARI C; ESCORIAZA G (2004). *Phellinus* species inducing hoja de malvón symptoms on leaves and wood decay in mature field-grown grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 59-65.
 - GEZAHGNE A; ROUX J; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ (2004). Identification of the causal agent of *Botryosphaeria* stem canker in Ethiopian *Eucalyptus* plantations. *South African Journal of Botany* 70(2): 241-248.
 - GINDRO K; ALONSO-VILLAVERDE V; VOINESCO F; SPRING J-L; VIRET O; DUBUIS P-H (2012). Susceptibility to downy mildew in grape clusters: New microscopical and biochemical insights. *Plant Physiology and biochemistry* 52: 140-145.
 - GODART S; SLACANIN I; VIRET O; GINDRO K (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 827-837.
 - GOLZAR H; BURGESS TI (2011). *Neofusicoccum parvum*, a causal agent associated with cankers and decline of Norfolk Island pine in Australia. *Australasian Plant Pathology* 40: 484-489.
 - GONCALVES MI; BAVARESCO L; CIVARDI S; FERRARI F (2011). Interactions between *Plasmopara viticola* infection and stilbene synthesis in leaves and berries of ten ‘Cabernet Sauvignon’ clones. *Vitis* 50 (3): 119-122.
 - GUERRERO JC; CIAMPI LP; CASTILLA AC; MEDEL FS; SCHLCHLI HS; HORMAZABAL EU; BENSCH ET; ALBERDI ML (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins, and phenols of wild and cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4): 537-544.
 - GUILFORD JM.; PEZZUTO JM (2011). Wine and Health: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62:4.
 - GUIÑAZU ME; PONCE MI; GUZMÁN J; JUÁREZ DE; CIRINCIONE MA (2005). Micropropagación de vid. Protocolo para variedades “criollas”. *Revista FCA UN Cuyo* 37(2): 93-103.

- GUTHA LR; CASASSA LF; HERBERTSON JF; NAIDU RA (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis Vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology* 10: 187.
- HAMM G; CARRÉ V; POUTARAUD A; MAUNIT B; FRACHE G; MERDINOGLU D; MULLER J-F (2010). Determination and imaging of metabolites from *Vitis Vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 335-342.
- HA DT; CHEN QC; HUNG TM; YOUN UJ; NGOC TM; THUONG PT; KIM HJ; SEONG YH; MIN BS; BAE K (2009a). Stilbenes and oligostilbenes from leaf and stem of *Vitis amurensis* and their cytotoxic activity. *Archives of Pharmacal Research* 32: 177-183.
- HA DT; KIM H; THUONG PT; NGOC TM; LEE I; HUNG ND; BAE K (2009b). Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 304-309.
- HALLEEN F; FOURIE PH; CROUS PW (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56: 637-645.
- HEATH RN; ROUX J; SLIPPERS B; DRENTH A; PENNYCOOK SR; WINGFIELD BD; WINGFIELD MJ (2010). Occurrence and pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* and *N. mangiferae* on ornamental *Tibouchina* species. *Forestal Pathology* 41(1): 48-51.
- HERRERO M; IBAÑEZ E; CIFUENTES A (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science* 28:883-897.
- HOLTHOFF E; BENDER J; PELLEGRINO P; FISHER A (2010). Quantum cascade laser-based photoacoustic spectroscopy for trace vapor detection and molecular discrimination. *Sensors (Basel)* 10(3): 1986-2002.
- HUANG X; MAZZA G (2011). Simultaneous analysis of serotonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 3890-3899.
- HUSSON F; JOSSE J; LE S; MAZET J (2007). FactoMInerR: Factor Analysis and Data Mining with RR package version 1.07. <http://factominer.free.fr>.
- IGNAT J; VOLF I; POPA VI (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* 126: 1821-1835.
- IRITI M; FAORO F (2009). Biocativity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications*, 4: 611-634.
- IRITI M; VITALINI S (2012). Chemical diversity of grape products, a complex blend of bioactive secondary metabolites. *The Natural Products Journal*, 1: 71-74
- JANG M; CAI L; UDEANI GO; SLOWING KV; THOMAS CF; BEECHER CW; FONG HH; FARNSWORTH NR. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
- JEAN-DENIS JB; PEZET R; TABACCHI R (2006). Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1112: 263-268.
- JEANDET P; BREUIL AC; ADRIAN M; WESTON LA; DEBORD S; MEUNIER P; MAUME G; BESSIS R (1997). HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal Chem* 69: 5172-5177.
- JEANDET P; DELAUNOIS B; CONREUX A; DONNEZ D; NUZZO V; CORDELIER S; CLÉMENT C ; COUROT E (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* 36(5): 331-341.

- JEANDET P; CLÉMENT C; COUROT E; CORDELIER S (2013). Modulation of Phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 14136-14170.
- JI M; LI Q; KI H; LOU H (2014) Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chemistry* 142: 61-65.
- JIANG L; HE S; SUN C; PAN Y (2012). Selective 1O₂ quenchers, oligostilbenes, from *Vitis wilsonae*: structural identification and biogenetic relationship. *Phytochemistry* 77: 294-303.
- KESKIN N; KUNTER B (2008). Production of trans-resveratrol in ‘Cabernet Sauvignon’ (*Vitis Vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis* 47(4): 193-196.
- KASHIMA T; TAKAHASHI K; MATSUURA H; NABETA K (2009). Biosynthesis of resorcylic acid lactone lasiodiplodin in *Lasiodiplodia theobromae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73(5): 1118-1122.
- KELLER M; VIRET O; COLE FM (2003). *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* 94: 316-322.
- KESKIN N; KUNTER B (2008). Production of trans-resveratrol in Cabernet Sauvignon (*Vitis Vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis* 47(4): 193-196.
- KESKIN N; KUNTER B (2009). The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on trans-resveratrol production in grapevine callus culture. *Tarim Bilimleri Dergisi* 15(1): 9-13.
- KIM M; HA T; AHN J; KIM H; KIM S (2009). Pterostilbene from *Vitis coignetiae* protect H₂O₂ induced inhibition of gap junctional intercellular communication in rat liver cell line. *Food and Chemical Toxicology* 47: 404-409.
- KING RE; BOMSER JA; MIN DB (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5: 65-70.
- KISELEV KV (2011). Perspectives for production and application of Resveratrol. *Appl Microbiol biotechnol* 90: 417-425.
- KISELEV KV; TYUNIN AP; MANYAKHIN AY; ZHURAVLEV YN (2011). Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 65-72.
- KOBAYASHI M; KATOH H; TAKAYANAGI T; SUZUKI S (2010). Characterization of thermotolerance-related genes in grapevine (*Vitis Vinifera*). *Journal of Plant Physiology* 167: 812-819.
- KONG Q; REN X; JIANG L; PAN Y; SUN C (2010). Scirpusin A, a hydroxystilbene dimer from Xinjiang wine grape, acts as an effective singlet oxygen quencher and DNA damage protector *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 823-828.
- KONG QJ; REN XY; HU N; SUN CR; PAN YJ (2011). Identification of isomers of resveratrol dimer and their analogues from wine grapes by HPLC/MSⁿ and HPLC/DAD-UV. *Food Chemistry* 127: 727-734.
- KORTEKAMP A (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 58-67.
- KOYAMA K; IKEDA H; POUDEL PR; GOTO-YAMAMOTO N (2012). Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry* 78: 54-64.
- KVASNICKA F; COPÍKOVÁ J; SEVÉIK R; KRÁTKÁ J; SYNTYTSIA A; VOLDFICH M (2008). Determination of phenolics acids by capillary zone electrophoresis and HPLC. *Central European Journal of Chemistry*. 6: 410-418.
- LAMBERT C (2012). Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Thèse Doctorat del’Université Bordeaux, Segalen, 2011. 180 pp.

- LAMBERT C; KHIOOK ILK; LUCAS S, TÉLEF-MICOULEAU N; MERILLON J-M; CLUZET S (2013). A faster and a stronger defense response: one of the key elements in grapevine explaining its lower level of susceptibility to Esca?. *Phytopathology* 103(10): 1028-1034.
- LANGCAKE P; PRYCE RJ (1976). The production of resveratrol by *Vitis Vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* 9(1): 77-86.
- LANGRAND C; PINZÓN LM (2009). Análisis de datos. Métodos y ejemplos. Escuela colombiana de Ingeniería Julio Garabito, Bogotá, Colombia.
- LARIGNON P; FONTAINE F; FARINE S; CLÉMENT C; BERTCH C (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *CR. Biologies* 332: 765–783.
- LARIGNON P (2010). Dépérissement de jeunes plantes. Des symptômes liés au champignon *Neofusicoccum parvum* déjà connu comme lié au black dead arm sur vignes adultes. *Phytoma* 635 : 41-43.
- LARIGNON P (2011). Les dépérissements liés aux *Botryosphaeriaceae*. In : Les maladies du bois de la vigne. Compte rendu des Journées nationales scientifiques maladies du bois de la vigne. Villefranche-sur-Saone, 16-17 de novembre de 2010. 13-15.
- LATOUCHE G ; BELLOW S ; POUTARAUD A ; MEYER S ; CEROVIC ZG (2013). Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. *Planta* 237: 351-361.
- LAVEAU C; LETOUZE A; LOUVET G; BASTIEN S; GUÉRIN-DUBRANA L (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48(1): 32-46.
- LAZZIZERA G, FRISULLO S, ALVES A, PHILLIPS JL (2008). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Pathology* 57: 948-956.
- LEBART L. (2007) DTM. Data and Text Mining, Software Estadística Exploratoria Multidimensional para datos complejos que incluyen datos numéricos y textuales. Disponible en <http://ses.telecom-paristech.fr/lebart/>.
- LEBLANC M; JOHNSON C; WILSON P (2008). Influence of pressing method on juice stilbene content in Muscadine and bunch grapes. *Journal of food Science* 73: H58-H62.
- LETOUSEY P; BAILLIEUL F; PERROT G; RABENOELINA F; BOULAY M; VAILLANT-GAVEAU N; CLÉMENT C; FONTAINE F (2010). Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology* 100(5): 424-431.
- LEYVA A; JARILLO JA; SALINAS J; MARTINEZ-ZAPATER JM (1995). Low-temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39-46.
- LIJAVETZKI D; ALMAGRO L; BELCHI-NAVARRO S; MARTÍNEZ-ZAPATER JM; BRU R; PEDREÑO MA (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Research Notes* 1:132.
- LIMA MRM; DIAS ACP (2012). *Phaeomoniella chlamydospora*-induced oxidative burst in *Vitis Vinifera* cell suspensions: role of NADPH Oxidase and Ca²⁺. *Journal of Phytopathology* 160: 129-134.
- LIN C-F; CHEN C-C; SHEN C-C; CHUI C-H; HUANG Y-L (2012). Simultaneous determination of Resveratrol derivatives in *Vitis thunbergii* plant by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of food and Drug Analysis* 20(2): 495-500.
- LINALDEDDU BT; SCANU B; SCHIAFFINO A; SERRA S (2010). First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49(3): 417-420.

- LOPEZ DA SILVA MdF 2004. Caracterización de fracciones polifenólicas de la fresa y sus implicancias tecnológicas. Tesis Doctorado Universidad de Salamanca, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Salamanca: 338p.
- LÓPEZ-NICOLÁS JM; GARCÍA-CARMONA F (2008). Rapid, simple and sensitive determination of the apparent formation constants of trans-resveratrol complexes with natural cyclodextrins in aqueous medium using HPLC. *Food chemistry* 109: 868-875.
- MACKE S; JERZ G; EMPL MT; STEINBERG P; WINTERHALTER P (2012). Activity-guided isolation of Resveratrol oligomers from a grapevine-shoot extract using countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 11919-11927.
- MAGEE JB; SMITH BJ; RIMANDO A (2002). Resveratrol Content of Muscadine Berries is Affected by Disease Control Spray Program. *HortScience* 37(2): 358-361.
- MAGNIN-ROBERT M; LETOUSEY P; SPAGNOLO A; RABENOELINA F; JACQUENS L; MERCIER L; CLÉMENT C; FONTAINE F (2011). Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology* 38(11): 856-866.
- MAJER P; HIDEG E (2012). Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a green-house. *Plant Physiology and Biochemistry* 50: 15-23.
- MALACARNE G; VRHOVSEK U; ZULINI L; CESTARO A; STEFANINI M; MATTIVI F; DELLEDONNE M; VELASCO R; MOSER C (2011). Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biology* 11: 114.
- MARTIN M; VESENTINI D; REGO C; MONTEIRO S; OLIVEIRA H; BOAVIDA FERREIRA RB (2009). *Phaeoemoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis Vinifera*. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 101–116.
- MARTOS S; ANDOLFI A; LUQUE J; MUGNAI L; SURICO G; EVIDENTE A (2008). Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevine, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121: 451-461.
- MATTIVI F; VRHOVSEK U; MALACARNE G; MASUERO D; ZULINI L; STEFANINI M; MOSER C; VELASCO R; GUELLA G (2011). Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis Vinifera* (Merzling x Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5364-5375.
- MAZZULLO A; DI MARCO S; OSTI F; CESARI A (2000). Bioassays on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 357-365.
- MEHL JWM; SLIPPERS B; ROUX J; WINGFIELD MJ (2011). *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia* 103(3): 534-553.
- MESSIAS JM; DA COSTA BZ; DE LIMA VMG; DEKKER RFH; REZENDE MI; KRIEGER N; BARBOSA AM (2009). Screening *Botryosphaeria* species for lipases: production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 426-431.
- MOHALI SR; SLIPPERS B; WINGFIELD MJ (2009). Pathogenicity of seven species of the *Botryosphaeriaceae* on *Eucalyptus* clones in Venezuela. *Australasian Plant Pathology* 38: 135-140.
- MONTERO C; CRISTESCU SM; JIMÉNEZ JB; OREA JM; HEKKERT S; HARREN FJM; GONZALEZ UREÑA A (2003). Trans-resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by High-resolution Laser-Based Techniques. *Plant Physiology* 131(1): 129-138.

- MORRISSEY JP; OSBOURN AE (1999). Fungal resistance of plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 708-724.
- MUGNAI L; SURICO G; SFALANGA A (1997). Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal mal de la esca. *Micol. Ital.* 26(1): 11-22.
- MUGNAI L; GRANITI A; SURICO G (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease* 83(5): 404-418.
- MURASHIGE T; SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NAUGLER C; MCCALLUM J; KLASSEN G; STROMMER J (2007). Concentration of *trans*-resveratrol and related stilbenes in Nova Scotia wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 58: 117-119.
- NOUR V; TRANDAFIR I; MUNTEAN C (2012). Ultraviolet irradiation of *trans*-resveratrol and HPLC determination of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in romanian red wines. *Journal of Chromatographic Science* 50: 920-927.
- OBREQUE-SLIER E; LÓPEZ-SOLÍS R; CASTRO-ULLOA L; ROMERO-DÍAZ C; PEÑA-NEIRA A (2012). Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis Vinifera* L.) during ripening. *LWT Food Science and Technology* 48: 134-141.
- PARAGE C; TAVARES R; RÉTY S; BALTENWECK-GUYOT R; POUTARAUD A; RENAULT L; HEINTZ D; LUGAN R; MARAIS GA; AUBOURG S; HUGUENEY P (2012). Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine. *Plant Physiology* 160(3): 1407-1419.
- PASTOR C ; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L ; CHIRALT A ; CHÁFER M; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ C (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulosa based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloides* 30: 272-280.
- PAVLIC D; SLIPPERS B; COUTINHO A; WINGFIELD MJ (2007). *Botryosphaeriaceae* occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology* 56(4): 624-636.
- PAVLIC D; SLIPPERS B; COUTINHO TA; WINGFIELD MJ (2009). Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the *Botryosphaeriaceae*: A case study on the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. *Mycologia* 51: 259-268.
- PAWLUS AD; WAFFO-TÈGUO P; SHAVER J; MÉRILLON J-M (2012). Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a Review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 46(2): 57-111.
- PAWLUS AD; SAHLI R; BISSON J; RIVIÈRE C; DELAUNAY J-C; RICHARD T; GOMÈS E; BORDENAVE L; WAFFO-TÈGUO P; MÉRILLON J-M (2013). Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 501-511.
- PEDRAS MSC; HOSSAIN S; SNITYNSKY RB (2011). Detoxification of cruciferous phytoalexins in *Botrytis cinerea*: spontaneous dimerization of a camalexin metabolite. *Phytochemistry* 72: 199-206.
- PÉREZ CA; WINGFIELD MJ; SLIPPERS B; ALTIER NA; BLANCHETTE RA (2009). *Neofusicoccum eucalyptorum* a *Eucalyptus* pathogen, on native *Myrtaceae* in Uruguay. *Plant Pathology* 58: 964-970.
- PÉROS JP; BERGER G (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivar to *Eutypa dieback*. *Agronomie* 14: 515-523.
- PÉROS J-P; BERGER G; LAHOUE F (1997). Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopathology* 87: 799-806.
- PETIT A-N; VAILLANT N; BOULAY M; CLÉMENT C ; FONTAINE F (2006). Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology* 96(10): 1060-1066.

- PEZET R; PERRET C; JEAN-DENIS J; TABACCHI R; GINDRO K; VIRET O (2003). δ -viniferin, a resveratrol dehydromer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5488-5492.
- PEZET R; GINDRO K; VIRET O; RICHTER H (2004a). Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43(2): 145-148.
- PEZET R; GINDRO K; VIRET O; SPRING J-L (2004b). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 297-303.
- PEZZUTO JM (2011). The phenomenon of resveratrol : redefining the virtues of promiscuity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215 : 123-130.
- PHILLIPS AJL (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146: 327-332.
- PIOTROWSKA H; KUCINSKA M; MURIAS M (2012). Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of Resveratrol. *Mutation Research* 750: 60-82.
- PITT W; TROUILLAS FP; GUBLER WD; SAVOCCHIA S; SOSNOWSKI MR (2013). Pathogenicity of diatrypeaceous fungi on grapevines in Australia. *Plant Disease* 97(6): 749-756.
- POOLER MR, JACOBS KA; KRAMER M (2002). Differential resistance to *Botryosphaeria ribis* among *Cercis taxa*. *Plant Disease* 86(8): 880-882.
- POUTARAUD A; LATOUCHE G; CEROVIC Z; MERDINOGLU D (2011). Quantification of stilbene in grapevine leaves by direct fluorometry and high performance liquid chromatography: spatial localization and time course of synthesis. *Journal international des sciences de la vigne et du vin, Macrowine*: 27-32.
- PÛSSA T; FLOREN J, KULDKEPP P; RAAL A (2006). Survey of grapevine *Vitis Vinifera* stem polyphenols by liquid Chromatography-diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7488-7494.
- PRODORUTI D; DE LUCA F; MICHELON L; PERTOT I (2009). Susceptibility to *Armillaria mellea* root rot in grapevine rootstocks commonly grafted onto Teroldego rotaliano. *Phytopathologia Mediterranea* 48(2): 285-290.
- RAVINDRA M; THOMAS P (1995). Sachet technique an efficient method for the acclimatization of micropropagated grapes (*Vitis Vinifera* L.). *Current Science* 68 (5): 546-548.
- RAYNE S; KARACABEY E; MAZZA G (2008). Grape cane waste as a source of *trans*-resveratrol and *trans*-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and antiphytopathogenic applications. *Industrial crops and products* 27: 335-340.
- REGO C ; VAZ A ; NASCIMENTO T ; CABRAL A ; OLIVEIRA H (2009). Diseases incited by *Botryosphaeriaceae* fungi in Portuguese vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 181.
- REPETTO O; BERTAZZON N; DE ROSSO M; MIOTTI L; FLAMINI R; ANGELINI E; BORGIO M (2012). Low susceptibility of grapevine infected by GLRaV-3 to late *Plasmopara viticola* infections: Towards understanding the phenomenon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 55-63.
- RICHARD T; PAWLUS AD; IGLÉSIAS M-L; PEDROT E; WAFFO-TEGUO P; MÉRILLON J-M; MONTI JP (2011). Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1: 103-108.
- RIEDEL H; AKUMO DN; SAW NM; SMETANSKA I; NEUBAUER P (2012). Investigation of phenolics acids in suspension cultures of *Vitis Vinifera* stimulated with Indanoyl-Isoleucine, N-Linolenoyl-L-Glutamine, Malonyl Coenzyme A and insect saliva. *Metabolites* 2: 165-177.
- ROBERT-SEILANIANZ A; GRANT M; JONES JDG (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just Jasmonate-Salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49:317-43.

- RODRÍGUEZ-BONILLA P; MÉNDEZ-CAZORLA L; LÓPEZ-NICOLÁS JM; GARCÍA-CARMONA F (2011). Kinetic mechanism and product characterization of the enzymatic peroxidation of pterostilbene as model of the detoxification process of stilbene-type phytoalexins. *Phytochemistry* 72(1): 100-108.
- ROMERO DE LA FUENTE I (2009). Metabolismo de los fenilpropanoides y proteínas relacionadas con la patogénesis en el mecanismo de respuesta de uva de mesa ("Vitis vinifera" L. cv Cardinal) a elevadas concentraciones de CO₂ y bajas temperaturas. Tesis Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, 254pp.
- ROMERO-PÉREZ AI; LAMUELA-RAVENTÓS RM; ANDRÈS-LACUEVA C; TORRE-BORONAT MC (2001). Method for the quantitative extraction of Resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 210-215.
- ROTTER A; CAMPS C; LOHSE M; KAPPEL C; PILATI S; HREN M; STITT M; COUTOS-THÉVENOT P; MOSER C; USADEL B; DELROT S; GRUDEN K (2009). Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: Extending MapMan ontology for grapevine. *BMC Plant Biology* 9:104.
- RUKACHAISIRIKUL V; ARUNPANICHLER J; SUKPONDMA Y; PHONGPAICHT S; SAKAYAROJ J (2009). Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. *Tetrahedron* 65: 10590-10595.
- SAKALIDIS ML; RAY JD; LANOISELET V; HARDI GESJ; BURGESS TI (2011). Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130: 379-391.
- SANTAMARIA A; ANTONACCI D; CARUSO G; CAVALIERE C; GUBBIOTTI R; LAGANÁ A; VALLETA A; PASQUA G (2010). Stilbene production in cell cultures of *Vitis vinifera* L cvs Red Globe and Michele Palieri elicited by methyl jasmonate. *Natural Product Research* 24: 1488-1498.
- SANTAMARIA AR; MULINACCI N; VALLETTA A; INNOCENTI M; PASQUA G (2011). Effects of elicitors on the production of Resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis Vinifera* L. cv Italia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 9094-9101.
- SANTOS C; FRAGOEIRO S; PHILLIPS A (2005). Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an *in vitro* approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae* 103(2): 187-198.
- SANTOS C; FRAGOERIO S; OLIVEIRA H; PHILLIPS A (2006). Response of *Vitis Vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. *Scientia Horticulturae* 107: 131-136.
- SAVOCCHIA S; STEEL CC; STODART BJ; SOMERS A (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46(1): 27-32.
- SBAGUI M; JEANDET P; FAIVRE B; BESSIS R; FOURNIOUX JC (1995). Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine "in vitro" cultures for resistance to grey mould "*Botrytis cinerea*". *Euphytica* 86(1): 41-47.
- SBAGHI M, JEANDET P, BESSIS R, LEROUX P (1996). Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology* 45: 139-144.
- SCHMIDLIN L; POUTARAUD A; CLAUDEL P; MESTRE P; PRADO E; SANTOS-ROSA M; WIEDEMANN-MERDINOGLU S; KARST F; MERDINOGLU D; HUGUENEY P (2008). A stress-inducible Resveratrol O-Methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology* 148: 1630-1639.
- SCHNEE S; VIRET O; GINDRO K (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 128-133.

- SCHNEE S; QUEIROZ EF, VOINESCO F; MARCOURT L; DUBUIS PH; WOLFENDER J-L; GINDRO K (2013). *Vitis Vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 61: 5459-5467.
- SCHOEDL K; FORNECK A; SULYOK M; SCHUHMACHER R (2011). Optimization, in-house validation, and application of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-based method for the quantification of selected polyphenolic compounds in leaves of grapevine (*Vitis Vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10787-10794.
- SCHOEDL K; SCHUHMACHER R; FORNECK A (2012). Study in the polyphenols of grapevine leaves according to age and insertion level under controlled conditions. *Scientia Horticulturae* 141: 37-41.
- SGHERRI C; RANIERI A; QUARTACCI MF (2013). Antioxidative responses in *Vitis Vinifera* infected by grapevine fanleaf virus. *Journal of Plant Physiology* 170: 121-128.
- SHAH MD, VERMA KS, SINGH K, KAUR R (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (*Botryosphaeriaceae*) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research* 9(2): 1217-1228.
- SHAO B; GUO H-Z; CUI Y-J; LIU A-H; YU H-L; GUO H; XU M; GUO D-A (2007). Simultaneous determination of six major stilbene and flavonoids in *Smilax china* by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 737-742.
- SHI J; ZENG Q; LIU Y; PAN Z (2012). *Alternaria* sp. MG1, a resveratrol-producing fungus: isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 369-379.
- SHI X; BI J; MORSE JG; TOSCANO NC; COOKSEY DA (2013). Effect of xylem fluid from susceptible and resistant grapevines on developmental biology of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 135: 127-135.
- SHIRAIISHI M; CHIJIWA H; FUJISHIMA H; MURAMOTO K (2010). Resveratrol production potential of grape flowers and green berries to screen genotypes for gray mold and powdery mildew resistance. *Euphytica* 176: 371-381.
- SOSNOWSKI MR; LARDNER R; WICKS TJ; SCOTT ES (2007). The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease* 91(8): 924-931.
- STEIMETZ E; TROUVELOT S; GINDRO K; BORDIER A; POINSSOT B; ADRIAN M; DAIRE X (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 89-95.
- STERVBO U; VANG O; BONNESEN C (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* 101: 449-457.
- SUN AY; SIMONYI A; SUN GY (2002). The « French Paradox » and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine* 32(4): 314-318.
- TASSONI A; DURANTE L; FERRI M (2012). Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 169: 775-781.
- TAVARES S; VESENTINI D; FERNANDES JC; FERREIRA RB; LAUREANO O; RICARDO-DASILVA JM; AMANCIO S (2013). *Vitis Vinifera* secondary metabolism as affected by sulfate depletion: diagnosis through phenylpropanoid pathway genes and metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 118-125.
- TAYLOR A; HARDY GESJ; WOOD P; BURGESS T (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34: 187-195.
- THOMIDIS T, MICHAILEDIS TJ, EXADAKTYLOU E (2011). *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131: 661-668.

- TIMPERIO AM; D'ALESSANDRO A; FAGIONI M; MAGRO P; ZOLLA L (2012). Production of the phytoalexins *trans*-resveratrol and *delta*-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 50: 65-71.
- TRAVADON R; ROLSHAUSEN PE; GUBLER WD; CADLE-DAVIDSON L; BAUMGARTNER K (2013). Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease* 97(12): 1529-1536.
- TRISKA J; VRCHOTOVÁ N; OLEJNICKOVÁ J; JILEK R; SOTOLAR R (2012). Separation and identification of highly fluorescent compounds derived from *trans*-resveratrol in the leaves of *Vitis Vinifera* infected by *Plasmopara viticola*. *Molecules* 17: 2773-2783.
- TROUILLAS FP; GUBLER WD (2010). Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology* 100(10): 1048-1056.
- URBEZ-TORRES JR; LEAVITT GM; GUERRERO JC; GUEVARA J; GUBLER WD (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92(4): 519-529.
- URBEZ-TORRES JR; GUBLER WD (2009). Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93(6): 584-592.
- VAHER M; KOEL M (2003). Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A* 990: 225-230.
- VAN LEEUWEN C; ROBY J-P; ALONSO-VILLAVARDE V; GINDRO K (2013). Impact of clonal variability in *Vitis Vinifera* Cabernet Franc on grape composition, wine quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 19-24.
- VAN NIEKERK JM; CROUS PW; GROENEWALD JZ; FOURIE PH; HALLEEN F (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 95(4): 781-798.
- VERGARA C, VON BAER D ; MARDONES C ; WILKENS A ; WERNEKINCK K ; DAMM A ; MACKE S ; GORENA T ; WINTERHALTER, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 909-933.
- VERGARA C; VON BAER D; MARDONES C; WILKENS A; WERNEKINCK K; DAMM A; MACKE S; GORENA T; WINTERHALTER P (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in Southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:929-933.
- VERSARI A, PARPINELLO GP; TORNIELLI GB; FERRARINI R; GIULIVO C (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 5531-5536.
- VITALINI S (2012). Effect of SAR inducers on grape secondary metabolites. Doctoral Course in Biologia Vegetale e Produttività della Pianta Coltivata Ciclo XXIV. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO, 93pp.
- VITRAC X; BORNET A; VANDERLINDE R; VALLS J; RICHARD T; DELAUNAY J-C; MÈRILLON J-M; TEISSEDRE P-L (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astrigin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 5664-5669.
- VRHOVSEK U; MALACARNE G; MASUERO D; ZULINI L; GUELLA G; STEFANINI R; VELASCO R; MATTIVI F (2012). Profiling and accurate quantification of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-pterostilbene and 11 viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18: 11–19.

- WAFFO TEGUO P; FAUCONNEAU B; DEFFIEUX G; HUGUET F; VERCAUTEREN J; MERILLON J-M (1998). Isolation, Identification, and Antioxidant Activity of Three Stilbene Glucosides Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Journal of natural Products* 61: 655-657.
- WANG X; HUAN W (2004). Effects of weak light on the ultrastructural variations of phloem tissues in source leaves of three-year-old nectarine tress (*Prunus persica* L. var. nectarine Ait). *Acta Botanica Sinica* 45: 688-697.
- WANG J; HO L; ZHAO Z; SEROR I; HUMALA N; DICKSTEIN DL; THIYAGARAJAN M; PERCIVAL SS; TALCOTT ST, PASINETTI GM (2006). Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A β neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental biology* 20: 2313-2320.
- WANG X; HURARON T; CHEN F; GANGEMI JD (2010a). Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. *Food Chemistry* 123: 1156-1162.
- WHITELAW-WECKERT MA; NAIR NG; LAMONT R; ALONSO M; PRIEST MJ; HUANG R (2006). Root infection of *Vitis Vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 36: 403-506.
- XIA E-Q; DENG G-F; GUO Y-J; LI H-B (2010). Biological activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 622-646.
- YU Y; ZHANG Y; YIN L; LU J (2012). The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. *Phytopathology* 102: 1094-1101.
- ZAMBONI A; VRHOVSEK U; KASSEMAYER HH; MATTIVI F; VELASCO R (2006). Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis* 45(2): 63-68.
- ZANZOTTO A; GARDIMAN M; LOVAT L (2008). Effect of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on *in vitro* grapevine plants. *Scientia Horticulturae* 116: 404-408.
- ZGA N; PAPASTOMOULIS Y; TORIBIO A; RICHARD T; DELAUNAY JC; JEANDET P; RENAULT JH; MONTI JP; MÉRILLON JM; WAFFO-TÉGUO P (2009). Preparative purification of antiamyloidogenic stilbenoids from *Vitis Vinifera* (Chardonnay) stems by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B* 877: 1000-1004.
- ZHANG W; CURTIN C; KIKUCHI M; FRANCO C (2003). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis Vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468.
- ZHANG A; FANG Y; LI X; MENG J; WANG H; LI H; ZHANG Z; GUO Z (2011). Occurrence and estimation of *trans*-resveratrol in one-year old canes from seven major Chinese grape producing regions. *Molecules* 16: 2846-2861.
- ZHANG F; WANG H; WU Q; LU Y; NIE J; XIE X; SHI J (2013). Resveratrol protects cortical neurons against microgila-mediated Neuroinflammation. *Phytotherapy Research* 27(3): 344-349.
- ZHENG C, CHOQUER M; ZHANG B; GE H; HU S; MA H; CHEN S (2011). LongSAGE gene-expression profiling of *Botrytis cinerea* germination suppressed by resveratrol, the major grapevine phytoalexin. *Fungal Biology* 115: 815-832.
- ZHU L; ZHANG Y; DENG J; LI H; LU J (2012). Phenolic concentrations and antioxidant properties of wines made from North American grapes grown in China. *Molecules* 17: 3304-3323.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS



4. Conclusiones generales y perspectivas futuras

El presente trabajo de Tesis permitió obtener las siguientes conclusiones:

Las enfermedades hoja de malvón y decaimiento de vides jóvenes, se encuentran ampliamente distribuidas en las distintas zonas vitícolas argentinas, causando notable impacto económico en el sector vitivinícola. En función de los datos obtenidos a campo, con los hongos aislados de las muestras recogidas, no fue posible establecer relaciones claras entre zonas vitícolas y/o variedad y hongos asociados.

Si bien la morfología de los teleomorfos difirió poco entre las distintas especies, un amplio rango de morfologías pudo ser observado en los anamorfos y por lo tanto fue a partir de ellos que se distinguieron diferentes especies. *L. theobromae*, *D. seriata* y *D. mutila* se identificaron con los caracteres reproductivos de los anamorfos (conidios) y de las características de la colonia.

El estudio de la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas, permitió discriminar los cinco grupos de aislamientos que se correspondieron con las especies *L. theobromae*, *D. seriata*, *D. mutila*, *N. luteum* y *F. aesculi*, quedando incluidos dentro de cada grupo los patrones de referencia respectivos. Los aislamientos presentaron un amplio rango de temperaturas de crecimiento, indicando una adaptación a las zonas vitícolas argentinas. Por otra parte, se pudo confirmar la patogenicidad de las especies detectadas, cumpliéndose con los postulados de Koch.

Debido a que la identificación en base a características morfológicas no permitió la discriminación definitiva entre las especies, se debió recurrir a métodos moleculares, los que confirmaron una primera identificación morfológica.

En una reacción de amplificación por PCR, es crucial la calidad y cantidad de la muestra a amplificar. Las metodologías de extracción con el detergente CTAB, según Ma *et al.* (2001) modificado y la alternativa del Kit comercial Qiagen, resultaron ser satisfactorias y confiables, obteniéndose ADN de calidad y cantidad suficiente para ser empleado en reacciones de PCR.

Se pusieron a punto métodos de amplificación por PCR de la región ITS para el análisis de secuencias, de hongos *Botryosphaeriaceae*. Esto permitirá la implementación de ésta técnica para efectuar un diagnóstico rápido en muestras futuras. El posterior análisis de secuencias de esta región, permitió identificar las distintas especies del género asociadas a los decaimientos de la vid.

El análisis de las secuencias de la región ITS del ADN ribosómico, identificó ambas especies entre los aislamientos argentinos, coincidiendo este resultado con el obtenido en el análisis factorial multivariante de las variables fenotípicas y permitiendo identificar así, aislamientos que no esporularon: *Fusicoccum aesculi* (*Teleom. B. dothidea*) y *Neofusicoccum luteum*.

Combinando métodos morfológicos y métodos moleculares (amplificación por PCR y secuenciación) se identificaron de manera consistente, cinco especies de la familia *Botryosphaeriaceae*, en los viñedos muestreados de Salta, La Rioja, San Juan y Mendoza, de mayor

a menor abundancia: *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Neofusicoccum luteum* y *Botryosphaeria dothidea* (Anamorfo: *Fusicoccum aesculi*).

Este es el primer estudio de caracterización de aislamientos de *Botryosphaeriaceae* en nuestro país y constituye la primera cita de las especies *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, teleomorfo *B. dothidea* (anamorfo *Fusicoccum aesculi*) y *Neofusicoccum luteum* afectando a vid en Argentina. De esta manera, se abren nuevas perspectivas en el diagnóstico rápido y seguro de hongos, la detección de infecciones en material de propagación y potenciales fuentes de inóculo.

Por otra parte, en el presente trabajo, se logró producir un stock de plantas de vid tanto en condiciones *in vitro* como en invernáculo, lo que permitió facilitar los estudios de biodefensa a futuro. Se puso a punto un sistema de inoculación del material vegetal creciendo en cultivo *in vitro* y en condiciones de invernáculo, lo que posibilitó el ensayo de patogenicidad y biodefensa frente a los hongos asociados a declinamiento de la vid.

Las variedades ensayadas mostraron de manera significativa, distinto grado de susceptibilidad a *Botryosphaeriaceae*, en función de una mayor mortalidad de plantas, menores contenidos de clorofila, muerte de hojas, brotación post-inoculación, presencia de micelio en torno a la inoculación y avance de lesión. Ello permitió establecer, un orden de variedades de menos tolerantes a más tolerantes, según los parámetros asociados a susceptibilidad: Malbec, Chardonnay, 5BB, Pinot Noir, Pedro Gimenez, 110R, *Vitis riparia*, Criolla chica y *Vitis rupestris*. En los ensayos *in vitro*, se observó una respuesta diferencial entre Malbec y *V. rupestris*, frente a *L. theobromae*. Se observó menor desarrollo de la parte aérea, hojas necróticas y muerte de tallos invadidos por el micelio del hongo desde las 24 h post-inoculación hasta la muerte de la planta en 4 días en Malbec y más tarde, en *V. rupestris*.

Debido a la diversidad de reportes referidos a los tipos de extractos y condiciones de extracción de compuestos fenólicos, particularmente, estilbenos a partir de hojas de vid, se plantearon las formas de extracción descritas en la sección 3.2.3. de acuerdo a una evaluación experimental de distintos métodos citados en la literatura. El método seleccionado para la determinación de estilbenos por Cromatografía de líquidos de alta resolución consistió en: extracción con MeOH, pH = 7; durante 10 min, en baño refrigerado (0 °C) y con ultrasonido. Las diferencias significativas entre plantas inoculadas y plantas control, confirmaron la inducción de *Trans*-resveratrol, *Trans*-resveratrol glicosidado y *Cis*-resveratrol glicosidado frente al ataque del hongo.

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro* y en invernáculo, los contenidos de estilbenos variaron de forma significativa en función del cultivar. Existieron diferencias de tolerancia/susceptibilidad varietal de la vid frente a hongos de madera y existió la inducción de producción de resveratrol y derivados como fitoalexinas, frente a la inoculación por inoculación con *L. theobromae*.

Los resultados demostraron que las respuestas de defensa, asociadas a la concentración de resveratrol, de un cultivar tolerante (*Vitis rupestris*) fue más elevada y precoz que en uno susceptible (Malbec) por inoculación artificial con *L. theobromae*. De esta manera se demostró la producción de resveratrol como respuesta de defensa de la vid frente a un hongo de madera, constituyendo un marcador que puede ser empleado para definir si una variedad es tolerante o susceptible a la hoja de malvón. Asimismo, los estudios con plantas en condiciones de cultivo *in vitro* fue importante para evaluar respuestas de defensa de la vid en tiempos más cortos y en condiciones controladas, mientras que cuando las plantas se cultivaron en invernáculo, se logró un mejor control de las condiciones abióticas externas.

A pesar de la importancia que tiene conocer la susceptibilidad de las diferentes variedades de *Vitis*, existe una notable falta de información al respecto. Conocer la susceptibilidad varietal permitirá hacer un seguimiento a campo especial de los viñedos. Los resultados obtenidos suponen un avance en la caracterización de algunas variedades pero es necesario realizar un estudio de campo que evalúe la susceptibilidad y tolerancia de vides adultas a las distintas especies de *Botryosphaeriaceae* encontradas en nuestro país. Es necesario además, estudiar los genes involucrados en la activación de respuestas de defensa que se transcriben en mayor o menor proporción, frente a la inoculación artificial, en una variedad de vid tolerante y otra susceptible a fin de profundizar el conocimiento de la interacción huésped-patógeno y las estrategias de defensa de la vid.

Actualmente, esto es posible mediante el análisis comparativo de secuencias de ARN. En el marco de esta Tesis, se inició la puesta a punto de extracción de ARN de vides inoculadas y no inoculadas *in vitro* de cv. Malbec y de *Vitis rupestris*, con *L. theobromae*, a fin de dilucidar qué genes están asociados a la tolerancia y qué genes están asociados a la susceptibilidad de esta enfermedad.

Por medio de esta Tesis, se comprobó la presencia de enfermedades de madera en el territorio nacional y se identificaron por primera vez en Argentina, D. mutila, N. luteum y B. dothidea, especies de Botryosphaeriaceae patógenas asociadas a los síntomas, además de L. theobromae y D. seriata. Además, se confirmaron variedades tolerantes y susceptibles en función de síntomas y contenidos de resveratrol siendo necesario conducir investigaciones para completar el conocimiento de la respuesta de la vid a la infección con hongos de madera. Estos resultados son esenciales para estudiar y comprender los mecanismos de defensa involucrados y plantear a futuro, estrategias de mejoramiento sanitario y genético que podrán ser integradas al sistema de protección de la vid. Sin un fungicida eficaz para el control de enfermedades de madera, sería conveniente una selección previa de variedades que ofrezcan cierta tolerancia a hongos de madera y catalogar las más susceptibles.

ANEXOS

ANEXO I MEDIOS DE CULTIVO

Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) modificado: con macronutrientes y micronutrientes diluidos a la mitad, vitaminas y hierro completo, biotina y ANA (ácido naftalen-acético).

| Componentes del medio | Reactivos | Concentración |
|--|---|---------------------------|
| Macronutrientes | NO ₃ (NH ₄) (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 825 mg.L ⁻¹ |
| | NO ₃ K (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 950 mg.L ⁻¹ |
| | SO ₄ Mg.7H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 185 mg.L ⁻¹ |
| | PO ₄ H ₂ K (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 85 mg.L ⁻¹ |
| | Cl ₂ Ca.2H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 220 mg.L ⁻¹ |
| Micronutrientes | BO ₃ H ₃ (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 3,1 mg.L ⁻¹ |
| | SO ₄ Mn.4H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 11,1 mg.L ⁻¹ |
| | SO ₄ Zn.4H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 4,3 mg.L ⁻¹ |
| | MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 0,125mg.L ⁻¹ |
| | SO ₄ Cu.5H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 0,0125 mg.L ⁻¹ |
| | Cl ₂ Co.6H ₂ O (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 0,0125 mg.L ⁻¹ |
| | IK (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 0,415 mg.L ⁻¹ |
| | SO ₄ Fe.7H ₂ O (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 27,8 mg.L ⁻¹ |
| EDTA.Na ₂ (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) | 37,3 mg.L ⁻¹ | |
| Vitaminas | Myo-inositol (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 100 mg.L ⁻¹ |
| | Tiamina-ClH (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 0,1 mg.L ⁻¹ |
| | Piridoxina-ClH (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 0,5 mg.L ⁻¹ |
| | Ácido nicotínico (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 0,5 mg.L ⁻¹ |
| | Glicina (Carlo Erba, Val de Reuil) | 2,0 mg.L ⁻¹ |
| | Biotina (Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 0,01 mg.L ⁻¹ |
| Hormona | ANA (ácido naftalen-acético, Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Germany) | 0,005 mg.L ⁻¹ |
| Fuente de carbono | Sacarosa | 30 g.L ⁻¹ |
| Otros | Agar (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) | 8 g.L ⁻¹ |

Esterilización en autoclave 15 minutos a 121°C



The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture

A.J.L. Phillips^{1*}, A. Alves², J. Abdollahzadeh³, B. Slippers⁴, M.J. Wingfield⁴, J.Z. Groenewald⁵, and P.W. Crous^{5,6,7}

¹Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal; ²Departamento de Biologia, CESAM, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; ³Plant Protection Department, Agriculture Faculty, University of Kurdistan, P.O. Box 416, Sanandaj, Iran; ⁴Department of Genetics, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria, 0002; ⁵CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands; ⁶Microbiology, Department of Biology, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; ⁷Wageningen University and Research Centre (WUR), Laboratory of Phytopathology, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands

*Correspondence: A.J.L. Phillips, alp@fct.unl.pt

Abstract: In this paper we give an account of the genera and species in the *Botryosphaeriaceae*. We consider morphological characters alone as inadequate to define genera or identify species, given the confusion it has repeatedly introduced in the past, their variation during development, and inevitable overlap as representation grows. Thus it seems likely that all of the older taxa linked to the *Botryosphaeriaceae*, and for which cultures or DNA sequence data are not available, cannot be linked to the species in this family that are known from culture. Such older taxa will have to be disregarded for future use unless they are epitypified. We therefore focus this paper on the 17 genera that can now be recognised phylogenetically, which concentrates on the species that are presently known from culture. Included is a historical overview of the family, the morphological features that define the genera and species and detailed descriptions of the 17 genera and 110 species. Keys to the genera and species are also provided. Phylogenetic relationships of the genera are given in a multi-locus tree based on combined SSU, ITS, LSU, EF1- α and β -tubulin sequences. The morphological descriptions are supplemented by phylogenetic trees (ITS alone or ITS + EF1- α) for the species in each genus.

Key words: *Botryosphaeriales*, canker pathogens, *Diplodia*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, Multi-Locus Sequence Analysis, *Sphaeropsis*, systematics.

Taxonomic novelties: **New species** – *Neofusicoccum batangarum* Begoude, Jol. Roux & Slippers. **New combinations** – *Botryosphaeria fabicerciana* (S.F. Chen, D. Pavlic, M.J. Wingf. & X.D. Zhou) A.J.L. Phillips & A. Alves, *Botryosphaeria ramosa* (Pavlic, T.I. Burgess, M.J. Wingf.) A.J.L. Phillips & A. Alves, *Cophinforma atrovirens* (Mehl & Slippers) A. Alves & A.J.L. Phillips, *Cophinforma mamane* (D.E. Gardner) A.J.L. Phillips & A. Alves, *Dothiorella pretoriensis* (Jami, Gryzenh., Slippers & M.J. Wingf.) Abdollahz. & A.J.L. Phillips, *Dothiorella thailandica* (D.Q. Dai, J.K. Liu & K.D. Hyde) Abdollahz., A.J.L. Phillips & A. Alves, *Dothiorella uruguayensis* (C.A. Pérez, Blanchette, Slippers & M.J. Wingf.) Abdollahz. & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia lignicola* (Ariyawansa, J.K. Liu & K.D. Hyde) A.J.L. Phillips, A. Alves & Abdollahz., *Neoscytalidium hyalinum* (C.K. Campb. & J.L. Mulder) A.J.L. Phillips, Groenewald & Crous, *Sphaeropsis citrigena* (A.J.L. Phillips, P.R. Johnst. & Pennycook) A.J.L. Phillips & A. Alves, *Sphaeropsis eucaalypticola* (Doilom, J.K. Liu, & K.D. Hyde) A.J.L. Phillips, *Sphaeropsis porosa* (Van Niekerk & Crous) A.J.L. Phillips & A. Alves. **Epitypification (basionym)** – *Sphaeria sapinea* Fries. **Neotypifications (basionyms)** – *Botryodiplodia theobromae* Pat., *Physalospora agaves* Henn, *Sphaeria atrovirens* var. *visci* Alb. & Schwein.

Published online: 30 September 2013; doi:10.3114/sim0021. Hard copy: September 2013.

INTRODUCTION

The *Botryosphaeriaceae* encompasses a range of morphologically diverse fungi that are either pathogens, endophytes or saprobes, mainly on woody hosts. They are found in all geographical and climatic areas of the world, with the exception of the polar regions. Their frequent association with plant diseases has stimulated substantial interest in these fungi, and much of this interest has been focussed on the systematics of species and genera.

Historical overview

The *Botryosphaeriaceae* was introduced by Theissen & Sydow (1918) as a sub-family in the *Pseudosphaeriaceae*. Although Theissen (1916) had earlier allocated the *Pseudosphaeriaceae* to the *Myriangiales*, Theissen & Sydow (1917) believed that the *Pseudosphaeriaceae* should be united with the *Dothideaceae* (Luttrell 1951). Theissen & Sydow (1918) established the sub-class the *Dothideineae* to accommodate the order *Pseudosphaeriales*, family *Botryosphaeriaceae*, and the genus *Botryosphaeria*. Petrak (1923) rejected Theissen & Sydow's (1918) classification and

placed *Botryosphaeria* in the sub-family *Pseudosphaerieae*, which he placed in the *Pleosporaceae* (*Sphaeriales*).

Miller (1928) showed that there was a fundamental difference between the tissues forming the ascoma and those forming the boundary of the locules. He also showed how these different tissue types were correlated with features of the ascocarp centrum. Taxa allocated to the *Sphaeriales* had true perithecial ascomata and paraphyses, while those assigned to the *Dothideales* had ascostromatic ascomata lacking paraphyses. Thus, *Botryosphaeria* species (*Pseudosphaeriaceae*) were allocated to the *Dothideales* because they lacked true perithecial walls (Miller 1928).

Nannfeldt (1932) re-grouped the *Euascomycetes* into three orders. The ascostromatic forms, where asci form in cavities in pre-formed stromata, were accommodated in the *Ascoloculares*. The true *Sphaeriales*, i.e., species in which the asci developed in a hymenium, were accommodated in the *Ascohymeniales*. Although these groups were not widely accepted at the time, they were consistent with the bitunicate and unitunicate groups later proposed by Luttrell (1955).

Concepts based on morphological features resulting from the ontogeny of the perithecial wall and the development of centrum

Copyright CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands.

You are free to share - to copy, distribute and transmit the work, under the following conditions:

Attribution: You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial: You may not use this work for commercial purposes.

No derivative works: You may not alter, transform, or build upon this work.

For any reuse or distribution, you must make clear to others the license terms of this work, which can be found at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode>. Any of the above conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

tissues were further developed by Miller (1938) and three orders were recognised. The *Sphaeriales* had perithecia and paraphyses, and the *Dothideales* encompassed ascostromatic forms with interthelial threads that appeared in the ascomatal cavity before the asci developed. Miller (1938) retained *Botryosphaeria* in the family *Pseudosphaeriaceae*. Thus, *Botryosphaeria* was accommodated in the *Pseudosphaeriales* and not in the *Dothideales*.

Luttrell (1951) recognised two major morphological groups in the pyrenomycetous fungi. He also emphasised the significance of ontogenetic characters of the ascomata in classification. The two major groups were those with single-walled asci or the unitunicate ascomycetes, and the loculoascomycetes, commonly referred to as the bitunicate ascomycetes (Luttrell 1955). Luttrell also identified eight forms of centrum development and highlighted the taxonomic value of sterile interthelial tissues. Since the type of the family *Pseudosphaeriaceae*, and the type of the genus *Pseudosphaeria* had been transferred to the *Dothideales*, the order *Pseudosphaeriales* was no longer tenable. Therefore, Luttrell (1955) replaced the name *Pseudosphaeriales* with *Pleosporales*, based on the most important genus in the group with that type of centrum development, and assigned *Botryosphaeria* to the *Pleosporales*.

In Barr's earlier work (1972, 1976), she had not studied specimens of *B. dothidea* in which the interthelial tissues were clearly visible, and despite the clear demonstration by Parguey-Leduc (1966) that *B. dothidea* exhibited a *Pleospora* centrum type, she classified *Botryosphaeria* in the *Dothideales*. Later, however, Barr (1979) acknowledged that *Botryosphaeria* species had a centrum typical of the *Pleosporales* and she concluded that the genus should reside in this order. This view was retained in subsequent publications (Barr 1983, 1987).

According to von Arx & Müller (1975) and von Arx (1981, 1987) the orders proposed by Luttrell (1955, 1973) and Barr (1972, 1987) comprised a collection of unrelated genera and the taxonomic characters used to separate the orders overlapped. Moreover, von Arx & Müller (1975) did not support the placement of closely related genera such as *Guignardia* and *Botryosphaeria* in different orders, i.e. the *Dothideales* and *Pleosporales* respectively (Luttrell 1973). For this reason von Arx & Müller (1975) placed all bitunicate ascomycetes in the single order *Dothideales*, comprising two suborders and 34 families, including the *Botryosphaeriaceae*. To complicate matters further, Sivanesan (1984) placed both *Botryosphaeria* and *Guignardia* in the *Dothideales* whereas Hawksworth *et al.* (1995) listed *Botryosphaeria* under the *Botryosphaeriaceae* and *Guignardia* under the *Mycosphaerellaceae*, both in the *Dothideales*. Hence the two major systems of classification were those of Barr (1987) in which *Botryosphaeria* is placed in the *Pleosporales*, and von Arx & Müller (1975) who placed the genus in the *Dothideales*. Eriksson (1981), however, emphasised that *Botryosphaeria* species have a centrum typical of the *Pleosporales* with pseudoparaphyses and pseudothecia.

The advent of DNA sequencing methods provided taxonomists with powerful tools to determine phylogenetic relationships in fungi at various taxonomic levels from species to orders. Berbee (1996) used gene sequences of the 18S rRNA gene (SSU) to study phylogenetic relationships amongst genera and orders of loculoascomycetes. However, the positions of the two *Botryosphaeria* species included in that study changed depending on the analysis used. Thus, in the neighbour-joining trees of Berbee (1996) these species usually clustered with species of *Dothidea* in the *Dothideales*, but in a single maximum likelihood tree they

clustered in the *Pleosporales*. In a subsequent study of 18S rRNA sequence data, Silva-Hanlin & Hanlin (1999) could not determine whether the *Botryosphaeria-Guignardia* clade corresponded to the *Dothideales* or the *Pleosporales*.

Schoch *et al.* (2006) constructed a multigene phylogeny based on SSU, 28S rRNA gene (LSU), translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) and RNA polymerase second largest subunit (RPB2) sequence data for 96 taxa in the *Dothideomycetes*. Species of *Botryosphaeria* and *Guignardia* formed a clade that could not be associated with any other order. For this reason they proposed a new order *Botryosphaeriales* accommodating the single family, the *Botryosphaeriaceae*.

Characteristics of the *Botryosphaeriaceae*

Detailed descriptions of the family *Botryosphaeriaceae* have been presented by several authors (von Arx & Müller 1954, 1975, Hawksworth *et al.* 1995, Eriksson 1981, Sivanesan 1984, Barr 1987). Members of the family are pathogenic, necrotrophic or saprobic, especially on woody plants.

The *Botryosphaeriaceae* were characterised primarily on the basis of their large, ovoid to oblong, usually hyaline, aseptate ascospores. Although this could appear to be an inadequate basis for recognition of a family, ascospores with this morphology have been considered as an unusual spore type among loculoascomycetes (Luttrell 1973, Eriksson 1981, Sivanesan 1984, Barr 1987). More recently, however, at least six lineages in the family have been recognised as having pigmented ascospores, and in three of these genera the ascospores are septate (Phillips *et al.* 2008). Therefore, this simple circumscription can no longer be considered suitable for the *Botryosphaeriaceae*. Liu *et al.* (2012) recently provided a comprehensive definition of the family in which they considered ascospores to be hyaline and aseptate, but that could become pigmented and septate with age. This is an equally unsuitable definition because ascospores in some genera become pigmented and 1-septate at an early stage of their development, long before they can be considered aged. Furthermore, a circumscription based solely on the sexual state is not suitable especially since some species are known only from their asexual state, while in others the sexual state is extremely uncommon. Given these conditions a modified circumscription of the family is provided by Slippers *et al.* (2013, this volume).

Genera in the *Botryosphaeriaceae*

When Theissen & Sydow (1918) introduced the *Botryosphaeriaceae* they included three genera, namely *Botryosphaeria*, *Phaeobotryon* and *Dibotryon*. Further genera were included over the years and the addition of separate generic names for asexual and sexual morphs resulted in the inclusion of at least 78 genera in the family (Mycobank, <http://www.mycobank.org>, accessed May 2013). Many of these genera have been determined to be synonyms, some new genera have been introduced, some of the older genera have been resurrected, yet others have been removed to other families. Liu *et al.* (2012) recognised 29 genera of which 17 are known in culture.

The application of DNA sequence analysis and phylogenetic inference has had a major impact on the systematics of the *Botryosphaeriaceae*. Crous *et al.* (2006) used DNA sequence data of the 28S rRNA gene to resolve 10 lineages within the family. The phylogenetic clades correlated with distinct morphological features and corresponded to separate genera. However, the LSU dataset that Crous *et al.* (2006) used could not resolve a large clade

that comprised *Diplodia*, *Lasiodiplodia* and related genera with pigmented conidia.

Phillips *et al.* (2008) attempted to resolve the phylogenetic and taxonomic status of species of *Botryosphaeriaceae* with pigmented ascospores. In a phylogeny based on SSU, the internal transcribed spacers and intervening 5.8S rRNA gene (ITS) and LSU together with EF1- α and β -tubulin sequence data they resolved six clades in the *Diplodia/Lasiodiplodia* complex and an additional four clades in the *Botryosphaeriaceae*. Damm *et al.* (2007) showed that *Aplosporella* represents yet another genus in the *Botryosphaeriaceae* while Rojas *et al.* (2008) determined that *Endomelanconiopsis* also resides in this family. Phillips & Alves (2009) considered *Melanops* to be a genus in the *Botryosphaeriaceae*. In a phylogeny based on SSU, ITS, LSU and RNA polymerase largest subunit (RPB1) sequences, Minnis *et al.* (2012) included *Kellermania* in the *Planistromellaceae*, sister to the *Botryosphaeriaceae*. Furthermore, Wikke *et al.* (2013, this volume) reinstated the *Phyllostictaceae* to accommodate *Phyllosticta* (= *Guignardia*), which they recognised as distinct from the *Botryosphaeriaceae*. Finally, Slippers *et al.* (2013, this volume) introduced new families to accommodate *Saccharata* (*Saccharataceae*), *Melanops* (*Melanopsaceae*), *Aplosporella* and *Bagnisiella* (*Aplosporellaceae*). Thus, 17 genera can now be recognised phylogenetically in the *Botryosphaeriaceae*. We consider morphological characters alone as inadequate to define genera or identify species, given the confusion it has caused in the past. Slippers *et al.* (2013, this volume) also illustrates how misleading some of the prominent conidial and ascospore characters can be to reflect evolutionary origin, given independent origins or losses of these characters over time. We therefore focus this paper on the 17 genera that can now be recognised phylogenetically, which concentrates on the species that are presently known from culture.

Circumscription of genera

Characters that are used to differentiate genera in the *Botryosphaeriaceae* have largely relied on the morphological features of the ascospores (Barr 1987, 1989, Hsieh & Chen 1994, Phillips *et al.* 2008) and especially the conidial states (Crous *et al.* 2006, Phillips *et al.* 2008). The most informative characters are conidial features such as pigmentation, wall thickness, and septation, but other characters such as presence or absence of paraphyses in the conidiomata can be useful. The phylogenetic value of these characters can only be meaningfully interpreted, however, in combination with additional data (e.g. sequence based molecular data), as illustrated by their misinterpretation in the past, and the multiple independent origins and losses of shared characters throughout the evolutionary history of the family (see Slippers *et al.* 2013, this volume).

Sexual morph morphology

Ascomata

Ascomata range from uniloculate, discrete structures (Fig. 1A, B) through to relatively large multiloculate structures (Fig. 1C, D). The uniloculate forms occur either individually and scattered over the host (Fig. 1E), or they can be aggregated in botryose clusters (Fig. 1F) of several hundred ascomata that are often united on a submerged basal stroma. In the species with multiloculate ascomata, conidiomata can occur within the same stroma. Sometimes the ascomata develop at the periphery of a central conidioma (Fig. 1G) and are united with the conidioma in a single stroma. When cut through horizontally the

contents are typically brilliant white (Fig. 1H). Irrespective of the form they take, ascomata in *Botryosphaeria* species are typical of the loculoascomyces in which the asci are formed within locules that develop in a pre-formed stroma. The tissues of the stromata are of *textura angularis* and made up of brown, thick-walled cells that turn blue-black in KOH and red-brown in lactic acid. The thickness of the stromata varies considerably not only between species but also with any given species. The walls can be as thin as just 5 or 6 cells layers, or it can be up to 30 or even more. The locules are lined with thin-walled, hyaline, flattened cells.

The centrum is of the *Pleospora* type in which the asci are interspersed with pseudoparaphyses that grow downwards and fuse at the base of the locule. The form of the ascomata is of little taxonomic value since even within a species ascomata can vary from uniloculate with relatively thin walls to complex multiloculate with thick walls and extensive stromatic tissue. This variation is probably in response to the substrate or the conditions under which the ascomata are formed. For example, ascomata in *B. dothidea* can be either simple, uniloculate structures scattered individually over the surface of the host tissue, or they can be aggregated in large botryose clusters. They can also be formed in large multiloculate stromata united with conidiomata. Furthermore, there does not appear to be any correlation between the form of the ascomata and the asexual genus associated with a particular species.

Asci

Asci are bitunicate of the fissitunicate type with a relatively thin ectotunica and a thick endotunica (Fig. 2A–C). The apex of the endotunica (Fig. 2D) is modified to form a well-defined apical chamber, which results from a displacement of the endotunica by the cytoplasm within the body of the ascus. No other structures can be detected in the ascus apex. Asci are clavate to elongate-clavate approaching cylindrical, but they are never truly cylindrical. They often have a short, indistinct stipe that terminates in a hoof-shaped cell attached to the inner wall of the base of the ascoma. Asci arise from a basal hymenium and grow up through the pseudoparaphyses (Fig. 2E). Ascospores are discharged forcibly by what has become known as the “Jack-in-the-box” process whereby the ectotunica splits transversely near the middle of the ascus and the endotunica elongates expelling the spores.

Ascospores

Ascospores are arranged within the asci in an irregular, overlapping biserial manner (Fig. 2A–C). Typically they are hyaline and aseptate (Fig. 2H–J), but they can be pale or dark brown (Fig. 2F, G), sometimes 1-septate, and may have an apiculus at one or both ends (Fig. 2G). The walls are smooth and in most species they are usually thin, but in some, notably those species with *Diplodia* asexual morphs, it can be moderately thick. Ascospores can be hyaline or coloured, aseptate or 1–2-septate. In species with hyaline, aseptate ascospores the spores can become translucent brown and 1–2-septate with age (Fig. 2K), and the walls may appear roughened (Fig. 2L) due to the deposition of melanin granules on the inner surface, giving the spores a somewhat verruculose appearance. Shapes range from fusiform to ovoid. They are usually widest in the middle part and the ends are subobtusely rounded.

Pseudoparaphyses

Pseudoparaphyses are hyphal-like, hyaline with thin walls and frequent septa (Fig. 2E), branched, frequently anastomosing. Often they are constricted at the septa. As the asci develop and mature,

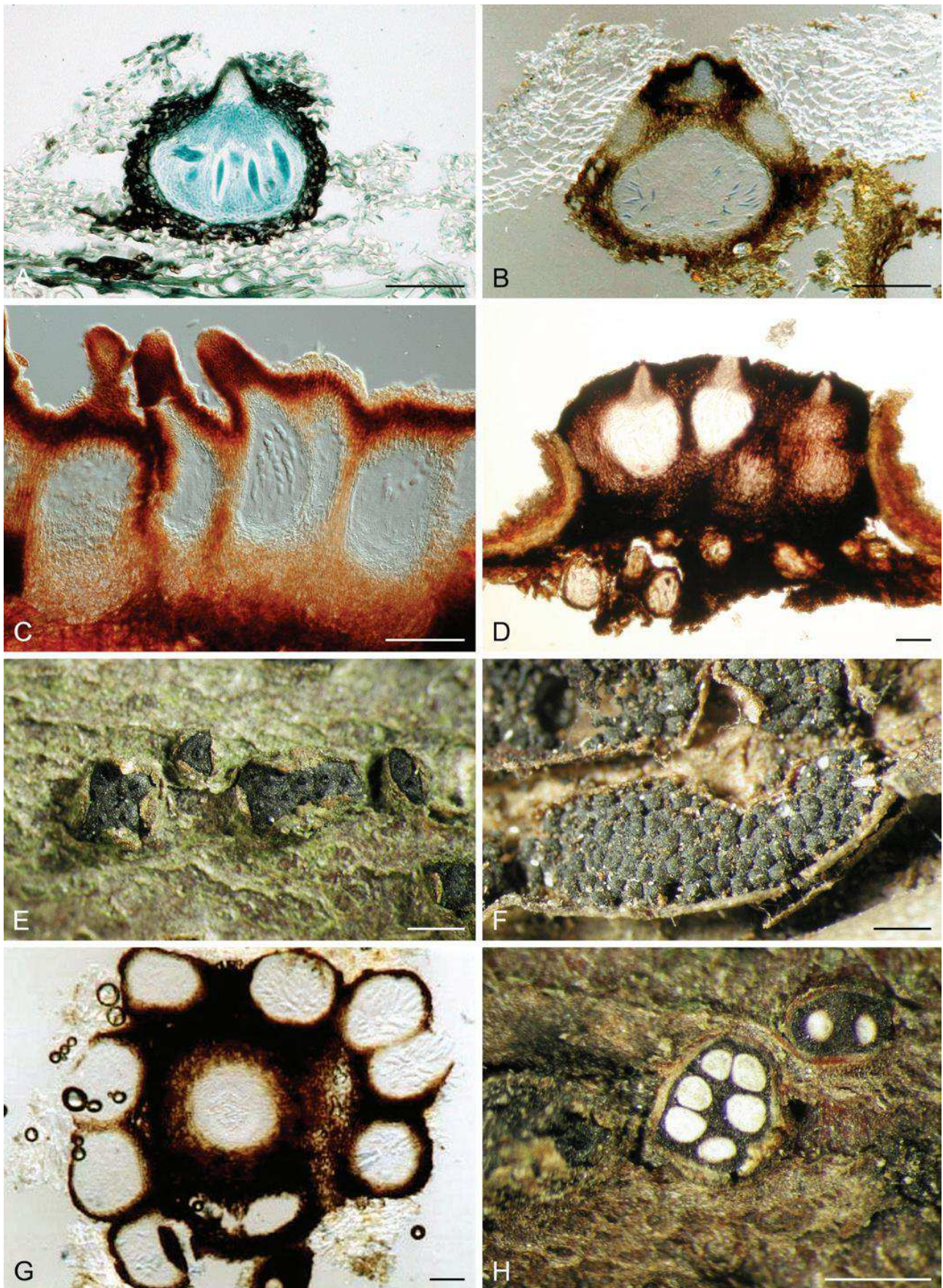


Fig. 1. Ascomata characters. A–D. Vertical sections through ascomata. E. Ascomata erumpent through host bark. F. Botryose clusters of ascomata. G. Transverse section through a central conidioma surrounded by ascomata. H. Ascomata cut through horizontally revealing the brilliant white contents. Scale bars: A–D, G = 100 µm, E = 1 mm, F, H = 500 µm.

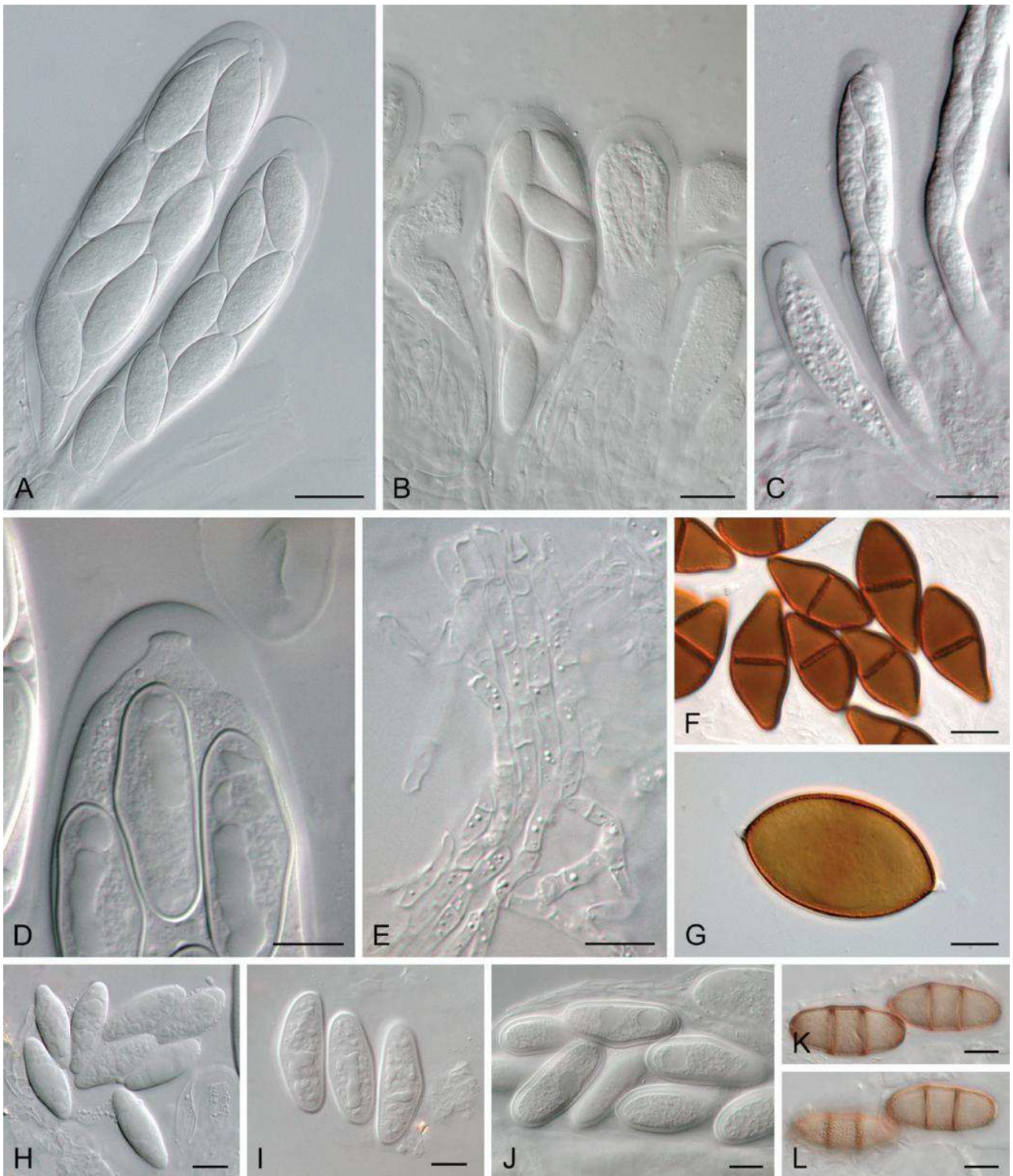


Fig. 2. Asci and ascospores. A–C. Asci. D. Ascus tip showing the apical chamber. E. Pseudoparaphyses. F. Brown, 1-septate ascospores. G. Brown, aseptate ascospore with an apiculus at either end. H–J. Hyaline, aseptate ascospores. K, L. Pale brown, 2-septate, aged ascospores in two different focal planes to reveal the verruculose inner surface of the wall. Scale bars: A–C = 20 μ m, D–L = 10 μ m.

the pseudoparaphyses gradually dissolve and only traces can be found in older ascomata.

Asexual morph morphology

Conidiomata

As with ascomata, conidiomata take on a variety of forms ranging from thin-walled uniloculate pycnidial to large, complex multiloculate

forms. Irrespective of the form, the conidiomata are stromatic, that is, the pycnidial cavity develops within a preformed stroma (Fig. 3). The tissues that make up the stomatal and conidiomata walls are identical to those found in the ascostroma.

Conidiophores

Conidiophores are not always present in all species. Even within a species, conidiophores may be present or absent. When present,

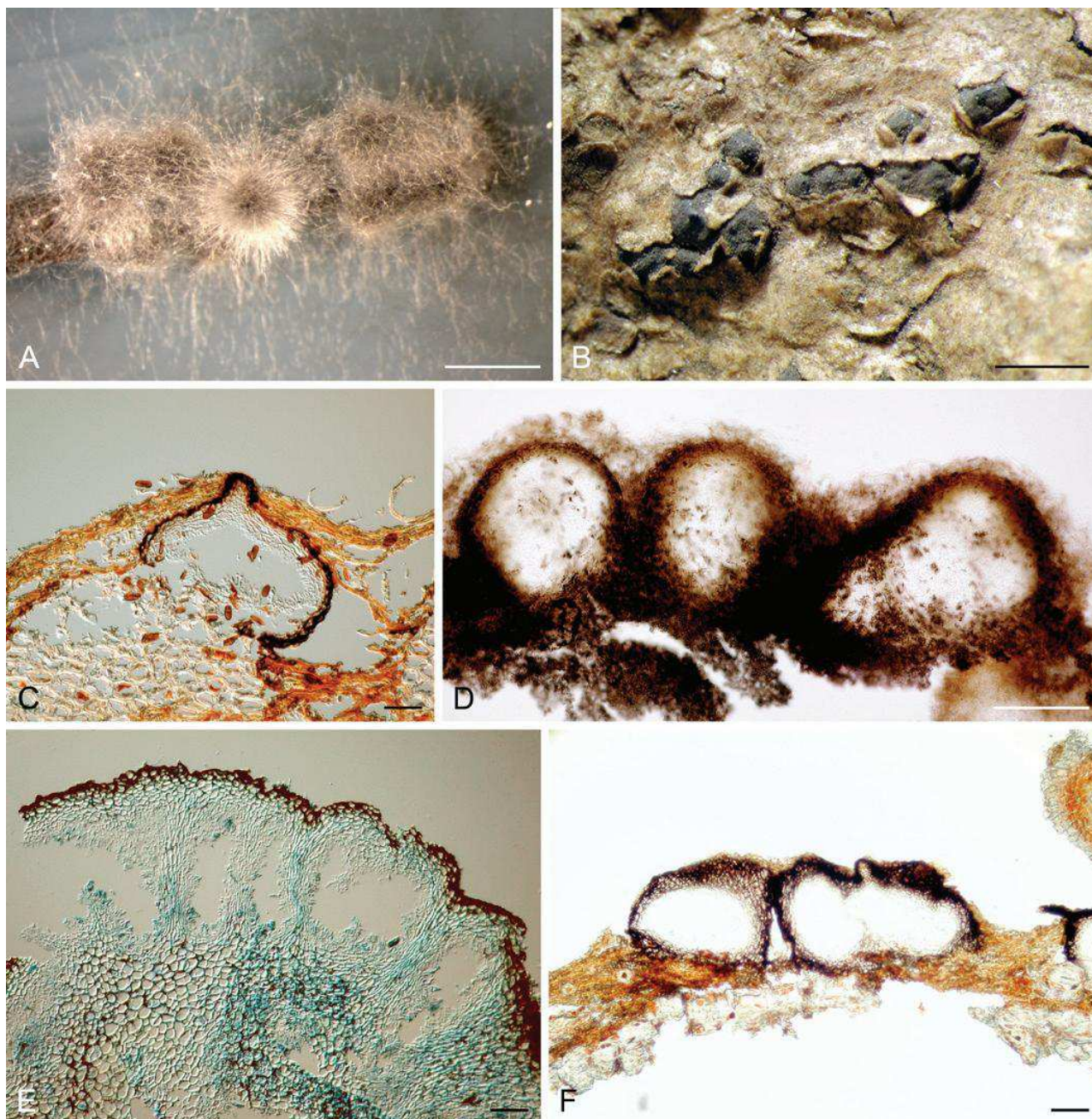


Fig. 3. Conidiomata. A. Conidiomata covered with mycelium, formed on pine needle in culture. B. Conidiomata erumpent through the host bark. C. Vertical section through a thin-walled conidioma. D. Section through conidiomata formed in culture. E. Transverse section through a stroma with several pycnidial locules. F. Vertical section through conidiomata. Scale bars: A = 1 mm, B, D = 500 μ m, C, E, F = 50 μ m.

they are hyaline, thin-walled and more or less cylindrical. Mostly they are not branched, but branched, septate conidiophores do occur.

Conidiogenesis

The first conidia are formed holoblastically at the tips of conidiogenous cells. Subsequent conidia are formed either by internal proliferation of the conidiogenous cells resulting in periclinal thickenings, or they may proliferate percurrently giving rise to two or three close or widely spaced annellations. Both types of proliferation can sometimes be seen on a single conidiogenous cell.

Conidiogenous cells are hyaline with a smooth, thin wall. Shapes vary from long cylindrical to short lageniform or

ampuliform. In species with fusicoccum-like asexual morphs, the conidiogenous cells are generally smaller and more slender than the more robust types found in species with diplodia-like asexual morphs (Fig. 4).

Conidia

Conidia of the *Botryosphaeriaceae* display the greatest variation between genera and species. Although variation between species is wide, variability within a species can also be quite considerable. Two basic types of conidia can be distinguished, namely those that are thin-walled, narrow and fusicoccum-like, and the thick-walled, wider, diplodia-like conidia. In addition to these two basic types of conidia, coloured, muriform conidia are found in the *Dichomera* synasexual morph of some *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum*

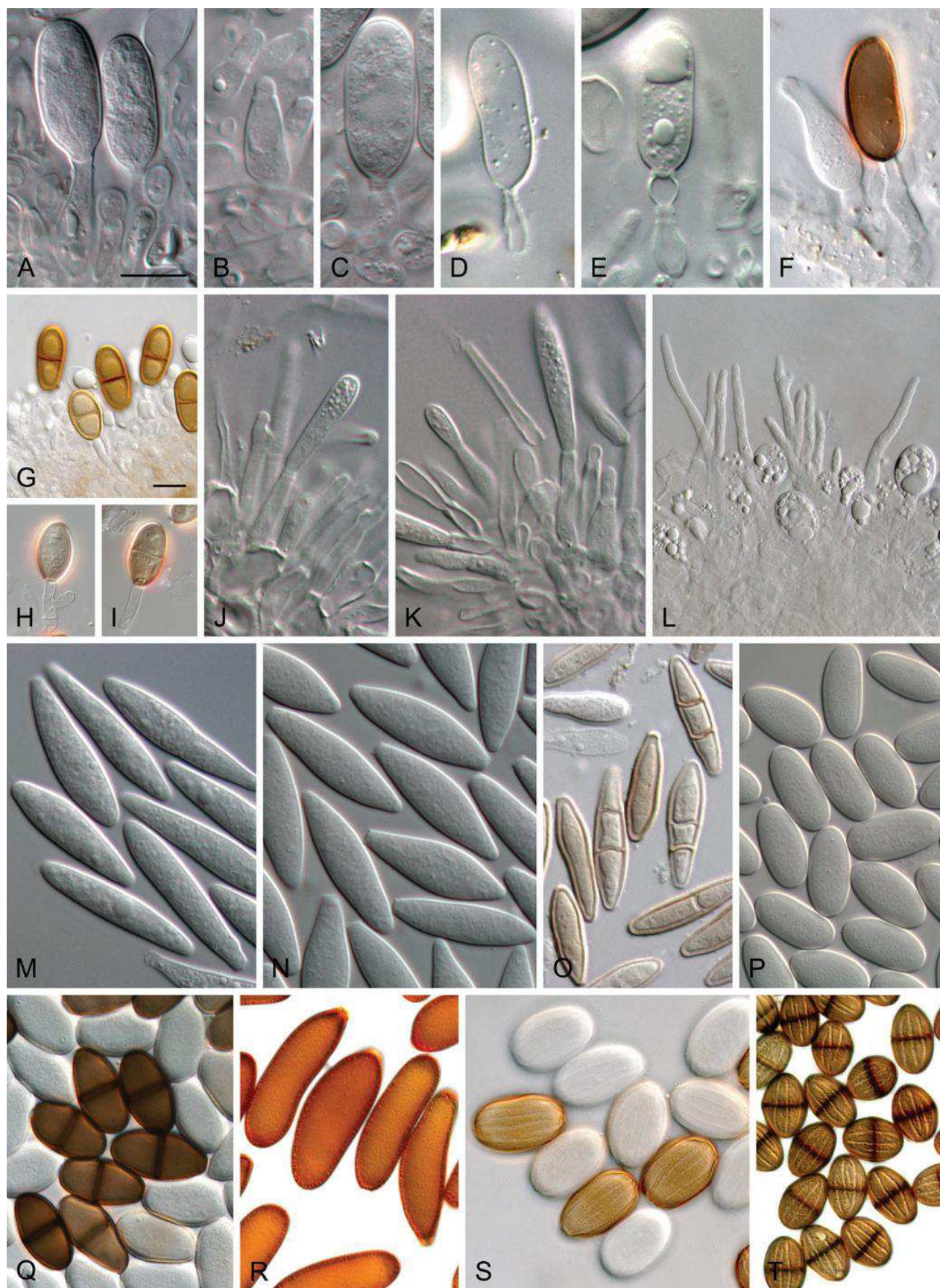


Fig. 4. Conidiogenous cells and conidia. A–K. Conidiogenous cells with periclinal thickenings (B, K) and annellations (A, C, D), the annellate cell in E has formed a secondary conidiogenous cell. F. Coloured, aseptate conidium of *Diplodia intermedia* attached to a conidiogenous cell. G. H, I. Coloured, 1-septate conidia of *Dothiorella* sp. attached to conidiogenous cells. L. Paraphyses arising between developing conidia in a *Lasiodiplodia* species. M. Hyaline, aseptate, thin-walled conidia of *Botryosphaeria dothidea*. N. Hyaline, aseptate, thin-walled conidia of *Neofusicoccum arbuti*. O. Coloured, septate conidia of *B. dothidea*. P. Hyaline, aseptate, thick-walled conidia of *Diplodia mutila*. Q. Hyaline, aseptate, coloured, 1-septate conidia of *Diplodia malorum*. R. Coloured, aseptate conidia of *Diplodia sapinea*. S. Striate, mature and immature conidia of *Barriopsis iraniana*. T. Striate, coloured, 1-septate conidia of a *Lasiodiplodia* species. Scale bars A, G = 10 μ m. Scale bar in A applies to B–F, J, K, M–O. Scale bar in G applies to H–I, L, P–T.

species. Furthermore, arthric chains of dry, powdery conidia are a prominent feature of *Neoscytalidium* species.

The thin-walled, fusicocum-like conidia range from fusiform to ovoid or elliptical, and typically they are hyaline and aseptate. However, the wall can become thicker and pale brown, and this may be related to aging. Other changes can take place just before germination when the normally hyaline, aseptate conidia can develop one or two septa and in some species they may become pale brown. In others, only the central cell becomes pigmented.

The diplodia-like conidia are relatively thick-walled and they can be hyaline or brown. Furthermore, they may be aseptate or 1-septate, sometimes two or even more septa can form. They are mostly ovoid with both ends broadly rounded. Externally the walls are smooth, but melanin deposits on the inner surface of the walls often give the conidia a verruculose appearance. In some species, especially those that have been assigned to the genus *Lasiodiplodia*, these deposits are arranged in longitudinal rows giving the conidia a striate appearance.

The timing of the onset of pigmentation varies considerably. In most *Diplodia* species, the conidia remain hyaline for a long time, and indeed they may never become brown. However, if they do become brown and septate, this occurs only after they have been discharged from the conidiomata, and in this case large numbers of brown, 1-septate conidia can be found on the surface of the host, surrounding the pycnidia. Nevertheless, in the group of species characterised by their brown, aseptate conidia (such as *D. seriata* and *D. sapinea*) pigmented conidia can be seen within the pycnidia, and often while the conidia are attached to the conidiogenous cells. In *Lasiodiplodia*, the conidia usually remain hyaline for a long time after they are formed, but they can become brown and 1-septate whilst enclosed within the pycnidia. Normally, however, pigmentation and septation happen after they have been discharged. Furthermore, in *Lasiodiplodia* the conidia invariably take on a striate appearance.

Conidia of some diplodia-like species become brown at an early stage of their development. For example, conidia of *D. seriata* become brown before they are discharged from the pycnidia. This pattern of development is also seen in *D. sapinea* and its close relative *D. scrobiculata*. In these three species (*D. sapinea*, *D. scrobiculata* and *D. seriata*) the conidia do not form septa, although one or more can develop at the time of germination. In one group of diplodia-like species the conidia become brown and septate at a very early stage, even before they are released from the conidiogenous cells. The genus *Dothiorella* was resurrected to accommodate these species (Phillips *et al.* 2005) and later *Spencermartinsia* was introduced to accommodate species with apiculate ascospores (Phillips *et al.* 2008).

Conidia of some species, both those in the diplodia-like group and the fusicocum-like group, undergo morphological changes just before they germinate, and these changes can have diagnostic value. Thus, normally hyaline, aseptate conidia can develop one or two septa and become pale translucent brown just before germination. This pigmentation can be either uniform over the entire conidium, or one or more cells may be differentially pigmented. However, this aspect of morphological and colour changes at the time of germination has not been standardised, nor has it been studied for all species. Similarly, as the conidia age they may become darker and some develop septa. The effect of aging on morphological features of these fungi is even less well standardised and can be difficult to interpret.

Paraphyses

The presence or absence of paraphyses can be a useful character for differentiating genera in the *Botryosphaeriaceae*. However, in practice this can be difficult to apply because paraphyses are not well-defined. In this work we refer to paraphyses as sterile hyphal elements that form between and intermingled with conidiogenous cells. We further regard paraphyses as only those elements that extend beyond the height of conidiogenous cells and this helps to distinguish paraphyses from immature, or developing conidiogenous cells. In working through published descriptions of species, any mention of paraphyses was critically re-examined and only those that comply with the above definition were accepted.

An example where paraphyses are useful taxonomic characters is in the differentiation of *Lasiodiplodia* from *Neodeightonia*. Both *Lasiodiplodia* and *Neodeightonia* have striate conidia, but only *Lasiodiplodia* species have paraphyses. Likewise, presence of paraphyses in *Sphaeropsis* differentiates this genus from *Diplodia*, which does not have pycnidial paraphyses. Length of the paraphyses and their morphology, especially the presence or absence of a swelling at the tip can also aid in the differentiation of species.

Spermatogonia

Spermatial states are common in the *Dothideomycetes*, and also known in several species in the *Botryosphaeriaceae*. However, where seen they are not consistently formed by all isolates of a particular species, that is, they can be present or absent. Thus, their importance in the taxonomy and discrimination of species and genera is of questionable value.

The aim of the current paper was to consider all the genera and species in the *Botryosphaeriaceae* known from culture, based on their morphological characters and DNA sequence based phylogenetic relationships. The intention is to provide a comprehensive and up to date document that can serve as a foundation on which future descriptions of species and other genera can build. Of the older taxa linked to the *Botryosphaeriaceae*, and for which cultures or DNA sequence data are not available, very few, if any, can be linked to the current species that are known from culture. Such older taxa will have to be disregarded for future use unless they are epitypified. The current document will serve as a starting point for that process.

MATERIALS AND METHODS

Morphology

Fresh collections and type specimens were examined for most of the species included in this study. However, where the type (or other suitable specimens) could not be obtained, and no fresh collections were available, the descriptions were adapted from the original published descriptions. Isolations were made directly from ascomata or conidiomata on the host whenever possible. The sporocarps were cut through vertically with a sterile scalpel, one half was crushed in a drop of sterile water and then spread over the surface of a plate of 1/2 strength Difco potato-dextrose agar (PDA; Becton, Dickinson & Co, Sparks, USA). After incubation for up to 24 h, single germinating spores were transferred to fresh plates of PDA. The other half of the fruit body was placed in a drop of water on a microscope slide and the fertile tissues (asci or conidiogenous layer) were dissected and mounted in 100 %

Although Liu *et al.* (2012) included *Auerswaldia* in the *Botryosphaeriaceae*, our analysis of the sequences of their isolates revealed that *A. dothiorella* is in fact a species of *Dothiorella* while *A. lignicola* appears to be best placed in *Lasiodiplodia*. Thus, at this stage there is no evidence to indicate that *Auerswaldia* should be considered as a genus in the *Botryosphaeriaceae*.

Therefore, we accept 17 genera in the *Botryosphaeriaceae*. These genera, defined as clades in the five-locus phylogeny, are also supported by morphological characteristics. These morphological characters provide the basis for the following key to the genera.

Key to the genera¹

- | | | |
|-----|--|--|
| 1. | Conidia formed within a pycnidium | 2 |
| 1. | Conidia formed as dry powdery arthric chains | <i>Neoscytalydium</i> |
| 2. | Conidia hyaline (only rarely turn brown with age) | 3 |
| 2. | Conidia brown (can remain hyaline for some time before becoming brown) | 8 |
| 3. | Conidia hyaline, with persistent mucous sheath | 4 |
| 3. | Conidia hyaline, mucous sheath absent | 5 |
| 4. | Conidia fusiform with apical mucoid appendages | <i>Tiarosporella</i> |
| 4. | Conidia cylindrical, not reaching 50 µm long | <i>Pseudofusicoccum</i> |
| 5. | Conidia thin-walled | 6 |
| 5. | Conidia thick-walled | 9 |
| 6. | Conidia mostly fusoid to ellipsoidal | 7 |
| 6. | Conidia cylindrical to cylindro-clavate | <i>Botryobambusa</i> |
| 7. | Most conidia longer than 30 µm | <i>Cophinforma</i> |
| 7. | Conidia mostly less than 30 µm long | <i>Botryosphaeria/Neofusicoccum</i> ² |
| 8. | Conidia with a single germ slit | <i>Endomelanconiopsis</i> |
| 8. | Germ slit absent | 9 |
| 9. | Conidia with longitudinal striations | 10 |
| 9. | Conidia not striate | 12 |
| 10. | Immature, hyaline conidia striate | <i>Barriopsis</i> |
| 10. | Immature conidia not striate | 11 |
| 11. | Pycnidial paraphyses present | <i>Lasiodiplodia</i> |
| 11. | Pycnidial paraphyses absent | <i>Neodeightonia</i> |
| 12. | Conidia aseptate | 13 |
| 12. | Conidia with 1 or more septa | 15 |
| 13. | Pycnidial paraphyses present | <i>Sphaeropsis</i> |
| 13. | Pycnidial paraphyses absent | 14 |
| 14. | Conidiogenous cells and conidia enclosed in mucoid sheath | <i>Macrophomina</i> |
| 14. | Mucoid sheath absent | <i>Diplodia</i> |
| 15. | Conidia become brown and septate only after dehiscence | 16 |
| 15. | Conidia become brown and 1-septate while attached to the conidiogenous cells before dehiscence | <i>Dothiorella/Spencermartinsia</i> ³ |
| 16. | Conidia frequently 2-septate | <i>Phaeobotryon</i> |
| 16. | Conidia 1-septate only rarely becoming 2-septate | <i>Diplodia</i> |

¹This key is based on morphology of the asexual morph because the sexual morph is not known for some genera, is very uncommon for others and has not been induced in culture for many of the genera.

²It is difficult to separate these two genera morphologically but phylogenetically they are distinct.

³These two genera cannot be separated on the morphology of the conidial states but the presence of apiculi on the ascospores of *Spencermartinsia* distinguishes it from *Dothiorella*.

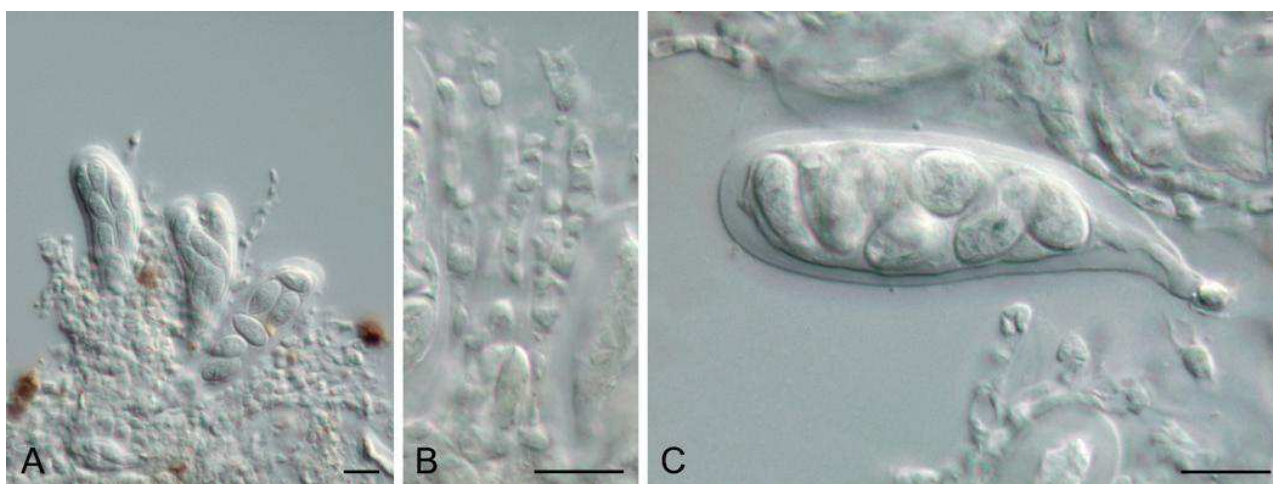


Fig. 7. *Botryobambusa fusicoccum*. A. Asci with ascospores. B. Pseudoparaphyses. C. Ascus with ascospores. Scale bars = 10 µm.

striate at a very early stage of development and the striations are clearly visible in young, hyaline conidia (Fig. 6). This is an unusual character not found in any other genus of the *Botryosphaeriaceae*. The sexual morph of *B. iraniana* has not been seen.

Botryobambusa R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Fungal Divers.* 57: 166. 2012. MycoBank MB801313.

Type species: Botryobambusa fusicoccum R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Fungal Divers.* 57: 166. 2012.

Ascomata dark brown to black, immersed under host epidermis to erumpent, gregarious, multiloculate, locules individual globose to subglobose or fused, vertical to the host surface, with a central, papillate, periphysate ostiole. *Asci* 8-spored, bitunicate, fissitunicate, clavate to cylindro-clavate, pedicellate, with well-developed ocular chamber. *Ascospores* hyaline, aseptate, smooth-walled, ellipsoidal to obovoid, thick-walled, surrounded by mucilagenous sheath. *Conidiomata* developing in stromatic clusters, fused, multiloculate, individually globose to subglobose, wall composed of several layers of *textura angularis*, broader at the base, outer layers dark-brown and thick-walled, inner layers hyaline and thin-walled. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, cylindrical to ellipsoidal, smooth. *Conidia* hyaline, aseptate, cylindrical to cylindro-clavate, thin-walled.

Notes: Botryobambusa was introduced by Liu *et al.* (2012) as a monotypic genus for *B. fusicoccum*. The genus is distinguished from the morphologically similar *Botryosphaeria* by its smaller asci and ascospores that are surrounded by a mucilagenous sheath. Phylogenetically the two genera are clearly distinct.

Species description

Botryobambusa fusicoccum R. Phookamsak, J.K. Liu & K.D. Hyde, *Fungal Divers.* 57: 166. 2012. MycoBank MB801314. Fig. 7.

Ascomata 90–152 µm diam, 104–152 µm high, dark brown to black, immersed under epidermis to erumpent, gregarious, visible as black dots or pailae on host surface, multiloculate, individual locules globose to subglobose or fused, vertical to the host surface,

wall 12–20 µm thick, composed of several layers of cells with thick brown wall. *Ostiole* central, papillate, persiphystae necks 40–60 µm diam, 30–55 µm long. *Pseudoparaphyses* frequently septate, constricted at septum. *Asci* (45–)55–66(–82) × 14–17(–18) µm, 8-spored, bitunicate, fissitunicate, clavate to cylindro-clavate, pedicellate, apically rounded with well-developed ocular chamber. *Ascospores* (8–)11–13(–14) × 5–7 µm, irregularly biseriate, hyaline, aseptate, ellipsoidal to obovoid, usually wider in the upper third, thick-walled, surrounded by an irregular mucilagenous sheath. *Conidiomata* superficial, clustered in a stroma, multiloculate, globose to subglobose, wall composed of several layers of *textura angularis*, outer layers dark and thick-walled, inner layers hyaline and thin-walled. *Conidiogenous cells* (8–)10–14(–16) × 3–5 µm, holoblastic, cylindrical to ellipsoidal, smooth-walled, hyaline. *Conidia* (21–)22–25(–26) × 5–7 µm, hyaline, aseptate, cylindrical to cylindro-clavate, thin-walled, with rough walls.

Type: Thailand, Lampang Province, Jae Hom District, Mae Yuag Forestry Plantation, on dead culms of *Bambusa* sp., 19 Aug. 2010, R. Phookamsak, **holotype** MFLU 11-0179.

Cultures: CBS 134113 = MFLUCC 11-0143 (ex-type), MFLUCC 11-0657.

Host: Bambusa sp. (Liu *et al.* 2012).

Known distribution: Thailand (Liu *et al.* 2012).

Notes: The genus *Botryobambusa* is presently monotypic, and only known from *Bambusa* sp. in Thailand. The sexual morph is characterised by having ascospores surrounded by an irregular sheath, while the asexual morph is fusicoccum-like in morphology (Liu *et al.* 2012).

Botryosphaeria Ces. & De Not., *Comm. Soc. crittog. Ital.* 1: 211. 1863; emend. Sacc., *Michelia* 1: 42. 1877. MycoBank MB635.

- = *Fusicoccum* Corda, in Sturm, *Deutschl. Flora*, III (Pilze) 2: 111. 1829.
- = *Thuemenia* Rehm, *Flora* 62: 123. 1878.
- = *Coutinia* J.V. Almeida & Sousa da Câmara, *Rev. Agron. Lisboa* 1: 392. 1903.
- = *Cryptosporina* Höhn. *Öst. bot. Z.* 55: 54. 1905.
- = *Amerodthis* Theiss. & Syd., *Ann. mycol.* 13: 295. 1915.

- = *Epiphyma* Theiss., Verh. zool.-bot. Ges. Wien 66: 306. 1916.
- = *Pyreniella* Theiss., Verh. zool.-bot. Ges. Wien 66: 371. 1916.
- = *Desmotascus* F. Stevens, Bot. Gaz. 68: 476. 1919.
- = *Creomelanops* Höhn. Sber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. 1 129: 146. 1920.
- = *Macrophomopsis* Petr., Ann. mycol. 22: 108. 1924.
- = *Rostrosphaeria* Tehon & E.Y. Daniels, Mycologia 19: 112. 1927.
- = *Apomella* Syd. Anns mycol. 35: 47. 1937.
- = *Caumadothis* Petr., Sydowia 24: 276. 1971.

Type species: Botryosphaeria dothidea (Moug. : Fr.) Ces. & De Not., Comment. Soc. Crittog. Ital. 1: 212. 1863.

Mycelium immersed, consisting of branched, septate, smooth, hyaline hyphae. *Ascomata* eustromatic, scattered, solitary, aggregated or forming botryose clusters, externally black, uniloculate, with a thick pseudoparenchymatic wall composed of *textura angularis* or *textura globosa* with the outer layers blackened and their cells more thickened, ostiolate, embedded in the substrate and partially erumpent at maturity. *Pseudoparaphyses* thin-walled, hyaline, frequently septate, constricted at the septa, deliquescing from the basal parts when the asci mature. *Asci* clavate or cylindric-clavate, stipitate, bitunicate, ectotunica thin, endotunica rather thick, 3-layered (*sensu* Eriksson 1981), with a prominent apical chamber, 8-spored, developing on a broad basal hymenial layer. *Ascospores* irregularly biseriolate in the ascus, hyaline, sometimes becoming pale brown with age, thin-walled, ovoid, fusoid, fusoid-ellipsoid, usually widest in the middle, straight or inequilateral, smooth, one-celled sometimes becoming 1–2 septate with age, contents smooth or granular, may be guttulate. *Conidiomata* stromatic, pycnidial, solitary or aggregated, often occurring within the same stroma as the ascomata, walls composed of dark brown, thick-walled *textura angularis*, becoming thin-walled and hyaline towards the inner layer. *Ostioles* indistinct to well-defined, round or irregular. *Paraphyses* hyaline, cylindrical, tapering to rounded ends, septate, arising between the conidiophores and conidiogenous cells. *Conidiophores* when present hyaline, cylindrical, branched at the base, smooth, 0–1 septate. *Conidiogenous cells* enteroblastic, integrated, hyaline, smooth, cylindrical, first-formed conidium holoblastic, determinate or proliferating percurrently with 1–2 indistinct annellations, or proliferating at the same level resulting in typical phialides (*sensu* Sutton 1980) with periclinal thickenings. *Conidia* hyaline, sometimes becoming olivaceous or darker with age, thin-walled, smooth, aseptate, occasionally forming one or two septa with age or before germination, with shapes varying from elliptical to fusiform or clavate, finely guttulate, apex subobtusate to obtuse, base conspicuously truncate with a minute marginal basal frill.

Notes: When Cesati & De Notaris (1863) introduced *Botryosphaeria* Ces. & De Not. they listed nine species (plus another six that they did not recombine in the genus) but they did not designate a type. Subsequently, Saccardo (1877) emended the genus to exclude hypocreaceous species. Von Höhnel (1909) designated *B. berengeriana* De Not. as the type, but this species was not included in the original description of the genus, although it was published soon after (De Notaris 1864). Theissen & Sydow (1915) suggested *B. quercuum* (Schwein.) Sacc. as the type since it was typical of Saccardo's (1877) emendation of *Botryosphaeria*, and this was accepted by von Arx & Müller (1954). However, *B. quercuum* also was not one of the original species of the genus and therefore is unsuitable as the type. Barr (1972) proposed *B. dothidea* (Moug. : Fr.) Ces. & De Not. as lectotype because it was one of the original species described, it conforms with Saccardo's (1877) emendation and it is an earlier synonym of *B. berengeriana*, von Höhnel's (1909)

designated type. The proposal of Barr (1972) has been accepted generally, and Slippers *et al.* (2004a) provided a revised description of this species based on the type specimen and fresh collections, and they designated a neotype and epitype.

Species in *Botryosphaeria* were described largely on the basis of the morphology of their ascomata and host associations, and this led to a proliferation of names. Von Arx and Müller (1954) examined 183 taxa and reduced them to 11 species, with extensive synonymies under *B. dothidea* and *B. quercuum*, together with nine new combinations. However, because von Arx & Müller (1954) did not take into account the characters of the asexual morphs and because species of *Botryosphaeria* are difficult to separate on the basis of sexual morph characters, these synonymies have not always been accepted (Shoemaker 1964, Sivanesan 1984, Slippers *et al.* 2004a).

The genus *Botryosphaeria*, based on the type species *B. dothidea*, typically has ascospores that are hyaline and aseptate, although they can become pale brown and septate with age (Shoemaker 1964, Sivanesan 1984, Denman *et al.* 2000, Alves *et al.* 2004, Phillips *et al.* 2005). Because some species of *Botryosphaeria* have ascospores that become brown with age, von Arx & Müller (1954) placed *Dothidea visci* with brown ascospores in *Botryosphaeria* as *B. visci*, and later they (von Arx & Müller 1975) also placed the dark-spored *Neodeightonia subglobosa* in *Botryosphaeria*. Since it is the type species of *Neodeightonia*, this genus was reduced to synonymy with *Botryosphaeria*. In recognising these synonymies, von Arx & Müller (1954, 1975) broadened the concept of *Botryosphaeria* to include species with brown ascospores.

Phillips *et al.* (2005) resurrected the genus *Dothiorella* for species with 1-septate conidia that darken at an early stage of development, and have sexual morphs with brown, 1-septate ascospores. Phylogenetically (ITS+EF1- α) the two species studied by Phillips *et al.* (2005) fell within *Botryosphaeria* as defined by the broad morphological concept recognised by von Arx & Müller (1954, 1975). For these reasons, Phillips *et al.* (2005) described the sexual morphs of *Dothiorella* as two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores. Subsequently, Luque *et al.* (2005) described another dark-spored *Botryosphaeria*, namely *B. viticola*, with a *Dothiorella* asexual morph.

At least 18 asexual genera have been associated with *Botryosphaeria s. lat.* (Denman *et al.* 2000) including *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, and *Lasiodiplodia*. The morphological diversity of the asexual morphs linked to species of *Botryosphaeria*, together with the broad concept of the sexual genus was clear evidence that *Botryosphaeria* encompassed several distinct genera. Thus, through a study of partial sequences of the LSU gene, Crous *et al.* (2006) showed that *Botryosphaeria s. lat.* is composed of 10 phylogenetic lineages, each of which corresponds to different asexual genera. To avoid the unnecessary introduction of new generic names, these authors chose to use existing asexual generic names for most of the lineages, and restricted the use of *Botryosphaeria* to *B. dothidea* and *B. corticis*. Seven species are currently recognised in *Botryosphaeria*.

DNA phylogeny

In an ITS phylogeny the ex-type isolate of *B. mamane* and isolates previously regarded as *B. mamane* clustered in *Cophinforma* together with *C. atrovirens* (Fig. 8). Based on combined ITS and EF1- α sequence data seven species are currently recognised in *Botryosphaeria* (Fig. 8). Apart from *B. fabicerciana* all species clades are supported by high bootstrap values.

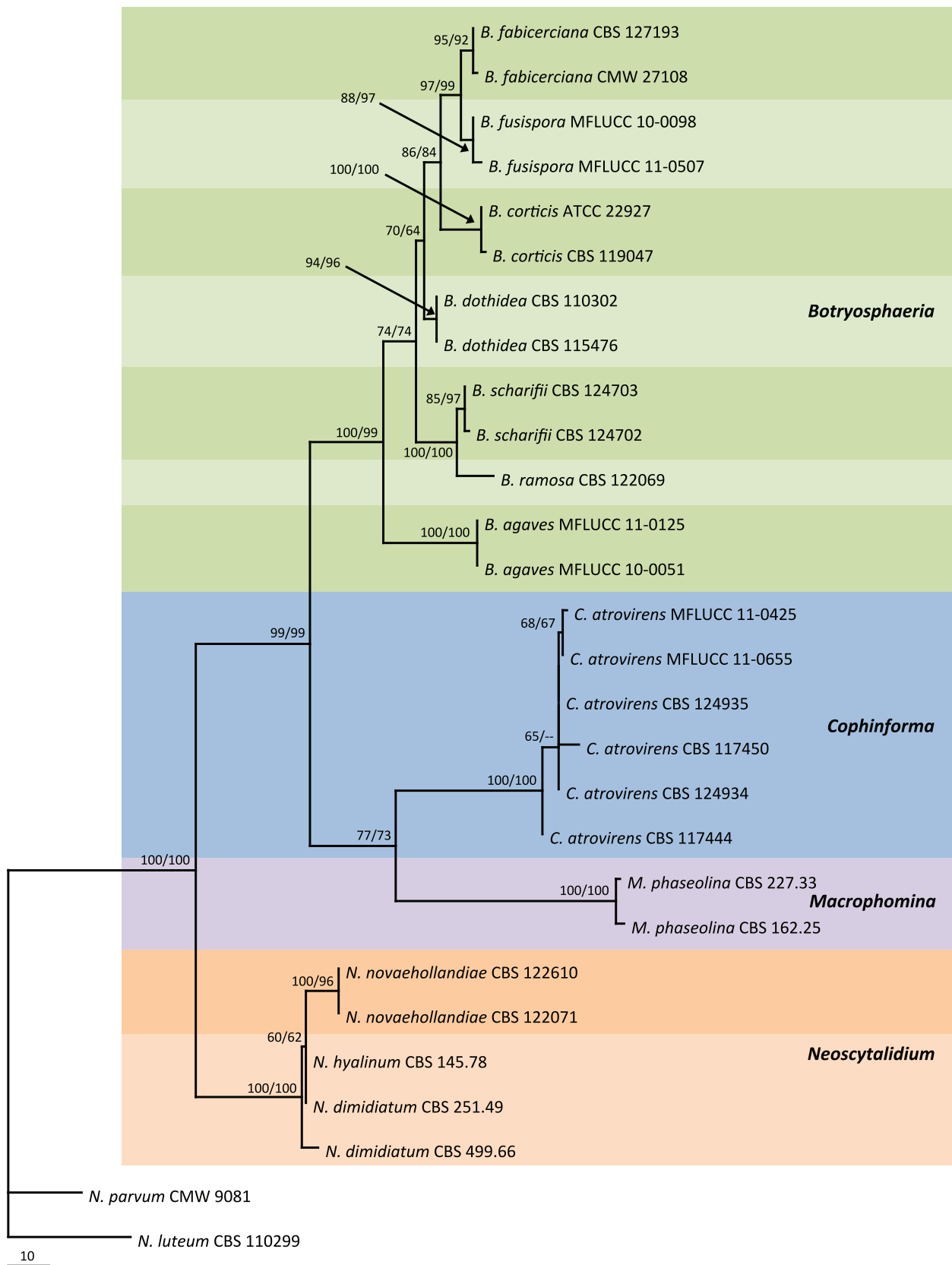


Fig. 8. One of 18 equally most parsimonious trees obtained from the combined analysis of ITS and EF1- α sequences from species of the genera *Botryosphaeria*, *Cophinforma*, *Macrophomina* and *Neoscytalidium*. The phylogenetic tree resulting from ML analysis using the general time reversible model of DNA evolution and assuming a discrete gamma distribution (GTR+G) had a topology identical to the MP tree presented. MP/ML values (> 50 %) resulting from 1000 bootstrap replicates are given at the nodes. The tree was rooted to *N. parvum* and *N. luteum*. Clades corresponding to genera and species are highlighted.

Key to *Botryosphaeria* spp.

1. Conidia 12–17 µm long 2
1. Most conidia longer than 18 µm 3
2. Average conidial length greater than 15 µm *B. scharifii*
2. Average conidial length less than 15 µm *B. ramosa*
3. On *Vaccinium* species, conidia 23.5–32.5 µm long *B. corticis*
3. On hosts other than *Vaccinium* 4
4. Conidia 16–22 µm long *B. fusispora*
4. Conidia mostly longer than 20 µm 5
5. Conidial L/W ratio greater than 4.5 *B. dothidea*
5. Conidial L/W ratio less than 4.0 *B. fabricerciana*

Notes: This key is based only on characters of the asexual morphs, because the sexual morphs are generally uncommon or have not been induced to form in culture. *Botryosphaeria agaves* was not included in the key because the asexual morph has never been reported.

Species descriptions

Botryosphaeria agaves (Henn.) E.J. Butler, Ann. Mycol. 9: 415. 1911. MycoBank MB119799. See Liu *et al.* (2012) for illustrations.

Basionym: *Physalospora agaves* Henn., Bot. Jb. 34: 51. 1905.

Ascomata 140–260 µm high × 600–800 µm diam, circular blackened areas on host tissue, immersed to erumpent on host, uni to multiloculate, aggregated, individually globose to subglobose, wall composed of several layers of dark brown walled cells of *textura angularis*. *Ostiole* circular, central, papillate. *Pseudoparaphyses* 3–5 µm wide, aseptate. *Asci* 91–122 × 27–38 µm, 8-spored, bitunicate with a thick endotunica, fissitunicate, clavate to cylindro-clavate, short pedicellate, with well-developed apical chamber. *Ascospores* 21–43 × 8–12 µm, biseriata in the ascus, hyaline, aseptate, ellipsoidal, fusiform, or inequilateral, usually wider at the middle, wall rough, surrounded by a mucilaginous sheath. *Conidiomata* not reported.

Type: **Tanzania**, Zanzibar, on leaves of *Agave sisalana*, Zimmerman, holotype presumably lost (not in B). **Thailand**, Chiang Rai Province, Mae Fah Luang District, Doi Tung, on living and dead leaves of *Agave* sp., 16 Jun. 2010, R. Phookamsak, **neotype designated here** MFLU 11–0161; MBT176241.

Cultures: MFLUCC 11–0125 = CBS 133992 (ex-neotype), MFLUCC 10-0051.

Host: *Agaves* sp. (Liu *et al.* 2012).

Known distribution: Thailand (Liu *et al.* 2012).

Notes: Liu *et al.* (2012) proposed a specimen from *Agave* sp. collected in Thailand (MFLU 11-0161) to serve as epitype for *B. agaves*. However, as they did not cite nor examine the holotype, their epitypification is invalid. We have also been unable to trace the holotype, thus designate the Thailand specimen as neotype to rectify this situation.

Botryosphaeria corticis (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll., Beitr. Kryptfl. Schweiz 11(1): 43. 1954. MycoBank MB293807. Figs 9, 10.

Basionym: *Physalospora corticis* Demaree & Wilcox, Phytopathology 32: 1074. 1942.

Ascomata abundant, embedded in the host becoming partially erumpent at maturity, up to 250 µm diam, conical with a dark brown to black wall composed of up to six cell layers of thick-walled *textura angularis* giving way to hyaline, thinner-walled cells lining the ascomata. *Asci* hyaline, clavate and stipitate, bitunicate with a thick endotunica and well-developed apical chamber, eight-spored, 145–165 × 25–28 µm, irregularly biseriata, formed amongst hyaline, thin-walled, septate *pseudoparaphyses*. *Ascospores* ellipsoid to fusoid, (24–)25.5–33(–34.5) × (9.5–)10–12.5(–13.5) µm, 95 % confidence limits = 28.5–30.1 × 11.2–11.9 µm (av. ± S.D. of 32 conidia = 29.3 ± 2.4 × 11.6 ± 1.0 µm), L/W = 2.5 ± 0.23. *Ascospores* germinate within 24 h at 25 °C and form unbranched germ tubes. *Conidiomata* developing in culture on pieces of poplar twigs after 14 d and producing conidia after 28 d, solitary to aggregated, dark brown to black, globose, up to 450 µm diam. *Conidiophores* cylindrical, hyaline, smooth, thin-walled, septate, branched in the upper parts, 7.5–14 × 3.5–4.5 µm, lining the entire inner surface of the conidiomata. *Conidiogenous cells* lageniform, hyaline, thin-walled, smooth, 12.5–17.5 × 2.5–4.5 µm, holoblastic producing a single conidium at the tip, rarely proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings. *Conidia* fusiform, widest in the middle to upper third, hyaline, thin-walled, smooth, apex acute, base truncate with a minute marginal frill and persistent mucous sheath, (20.5–)23.5–32.5(–34.5) × (5.0–)5.5–7(–7.5) µm, 95 % confidence limits = 27.7–30.2 × 6.2–6.7 µm (av. ± S.D. of 26 conidia = 28.9 ± 3.4 × 6.4 ± 0.7 µm), L/W = 4.5 ± 0.46. *Spermatogonia* globose, dark brown to black. *Spermatophores* cylindrical, hyaline, branched, 11–14 × 2–3 µm. *Spermatogenous cells* hyaline, thin-walled, smooth, 14.5–20.5 × 1.5–2.3 µm, producing conidia at their tips, proliferating internally to form periclinal thickenings. *Spermatia* rod-shaped with obtuse ends, hyaline, thin-walled, smooth, 4–6 × 1.5–2 µm.

Culture characteristics: Colonies on CMA reaching 28–40 mm diam after 7 d at 25 °C, initially white becoming olive-green with clumps of loosely aggregated hyphae.

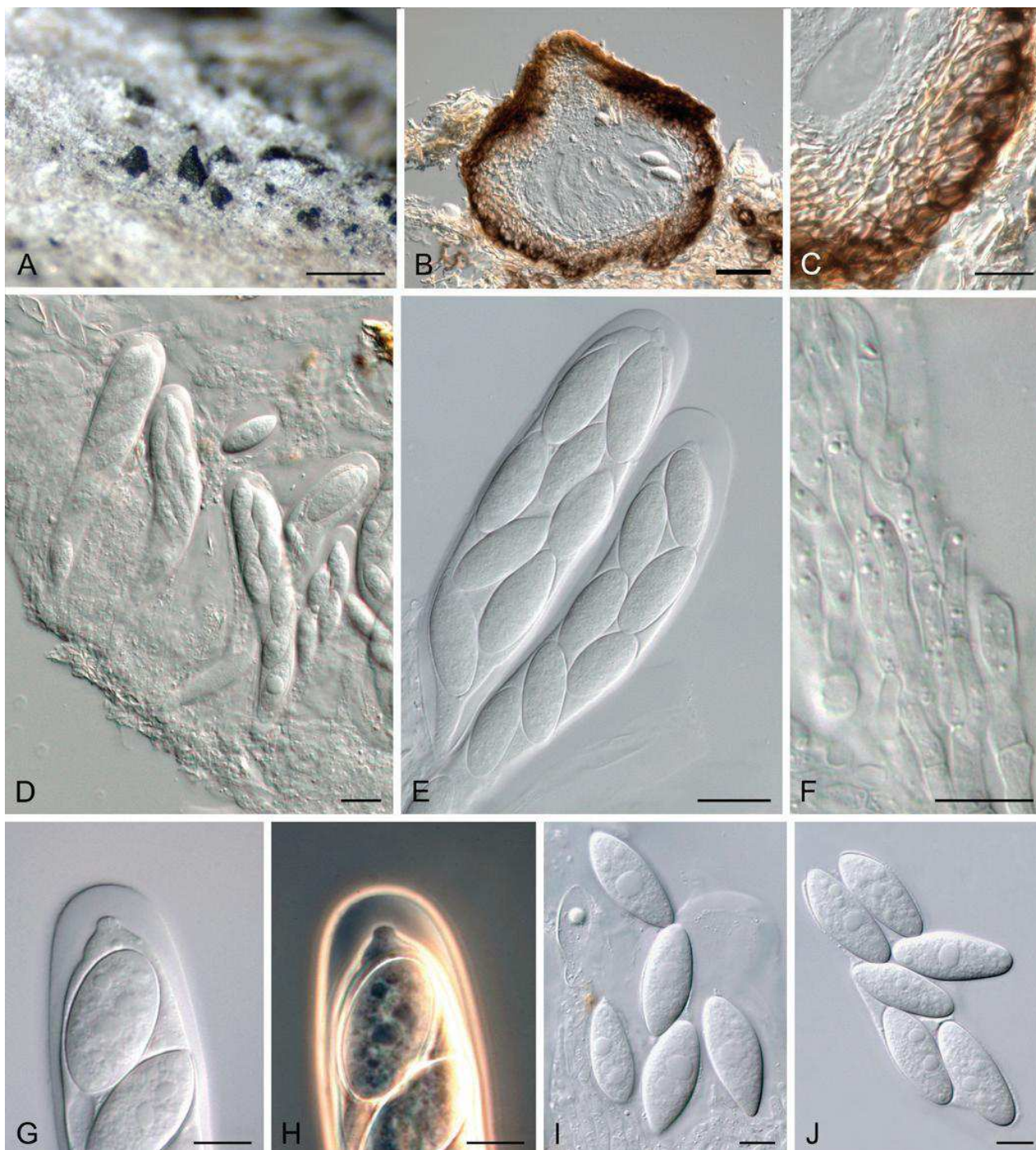


Fig. 9. *Botryosphaeria corticis*. A. Ascomatal necks emerging through the bark of *Vaccinium*. B. Section through an ascoma. C. Section through the ascomal wall. D, E. Asci with ascospores. F. Septate pseudoparaphyses. G, H. Apical chamber at tip of an ascus as seen in interference contrast (G) or phase contrast (H). I, J. Ascospores. Scale bars: A = 0.5 mm, B = 50 μ m, C, E = 20 μ m, D, F–J = 10 μ m.

Type: USA, North Carolina, Atkinson, *Vaccinium corymbosum*, 14 Feb. 1940, J.B. Demaree, **holotype** BPI 598729; New Jersey, Hammonton, on cankered stems of *V. corymbosum*, May 2005, P.V. Oudemans, CBS H-19706 **epitype** (designated by Phillips *et al.* 2006a).

Cultures: CBS 119047, CBS 119048 (ex-epitype).

Hosts: *Vaccinium* species including *V. corymbosum*, *V. ashei*, *V. tenellum* and *V. virgatum* (Phillips *et al.* 2006, Wright & Harmon 2010).

Known distribution: USA (Florida, Georgia, Maryland, Mississippi, New Jersey, North Carolina) (Phillips *et al.* 2006, Wright & Harmon 2010).

Notes: This species appears to be restricted to *Vaccinium* spp. and has not been reported outside of the continental USA. The mucilaginous sheath surrounding the conidia is unusual in *Botryosphaeria*.

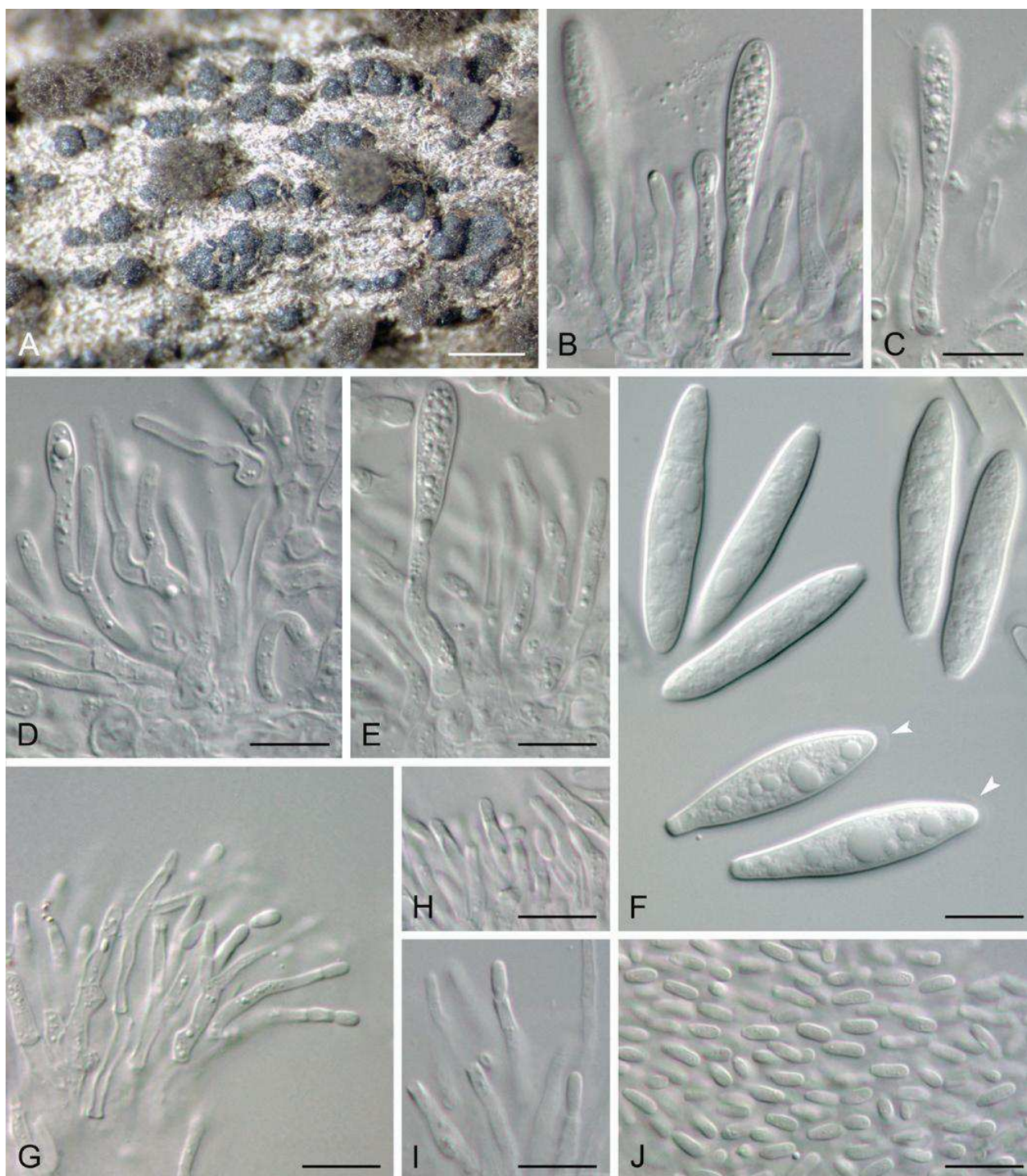


Fig. 10. *Botryosphaeria corticis*. A. Conidiomata formed on poplar twigs in culture. B–E. Conidiogenous cells and paraphyses. F. Conidia with mucous sheath (arrowheads). G–I. Spermatogenous cells. J. Spermatia. Scale bars: A = 0.5 mm, B–J = 10 µm.

Botryosphaeria dothidea (Moug.: Fr.) Ces. & De Not., Comm. Soc. Crittog. Ital. 1: 212. 1863. MycoBank MB183247. Figs 11, 12.

Basionym: *Sphaeria dothidea* Moug., In: Fries, *Syst. Mycol.* (Lundae) 2(2): 423. 1823.

- = *Botryosphaeria berengeriana* De Not., Sfer. Ital. 82. 1863 [1864].
- = *Fusicoccum aesculi* Corda, In: Sturm, *Deutschl. Fl., Abth. 3*, 2: 111. 1829.
- = *Sphaeria coronillae* Desm., *Annls Sci. Nat., Bot., sér. 2* 13: 188. 1840.
- = *Macrophoma coronillae* (Desm.) Höhn., *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 28: 479. 1910.

- = *Macrophomopsis coronillae* (Desm.) Petr., *Annls mycol.* 22(1/2): 108. 1924.
- = *Dothiorella coronillae* (Desm.) Petr., *Sydowia* 16(1–6): 188. 1963.
- = *Fusicoccum coronillae* (Desm.) Vanev. & Aa, In: van der Aa & Vanev, *A Revision of the Species Described in Phyllosticta* (Utrecht): 192. 2002.
- = *Phyllosticta divergens* Sacc., *Malpighia* 5: 274. 1891.

Ascostroma erumpent, 200–500 µm diam. *Ascomata* pseudothecial, forming a botryose aggregate of up to 100, sometimes solitary, globose with a central ostiole, ¼ to ½ emergent, rarely embedded, papillate or not, brown to black, pseudothecial wall comprising 5–15

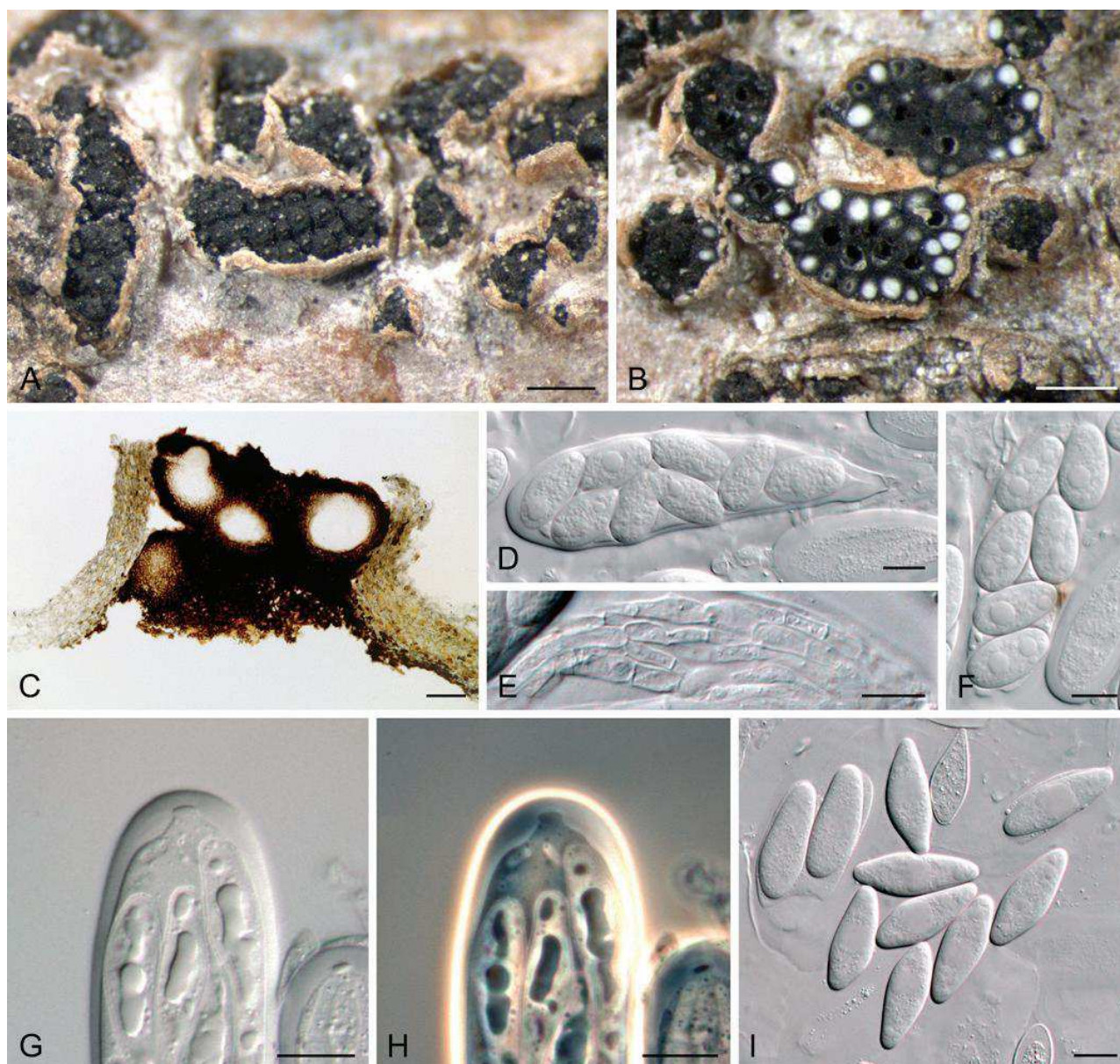


Fig. 11. *Botryosphaeria dothidea*. A. Botryose clusters of ascomata erumpent through the bark of a poplar twig. B. Transverse section through ascomata revealing brilliant white contents. C. Section through ascomata. D. Ascus with ascospores. E. Septate pseudoparaphyses. F. Ascospores. G, H. Ascus tip showing apical chamber as seen by interference contrast (G) or phase contrast (H). I. Ascospores. Scale bars: A, B = 0.5 mm, C = 100 μm , D–I = 10 μm .

layers of *textura angularis*, outer region of dark brown cells, inner region of 2–4 layers of hyaline cells lining the locule. *Asci* bitunicate, clavate, 63–125 \times 16–20 μm , forming between pseudoparaphyses. *Pseudoparaphyses* filiform, septate, constricted at the septa, rarely branched, 2–4 μm wide. *Ascospores* fusoid to ovoid, sometimes with tapered ends and appearing spindle-shaped, biserial in the ascus, (17–)19–24(–32) \times (6–)7–8(–10) μm (av. of 102 ascospores = 22.7 \times 7.8 μm), L/W = 2.9. *Conidiomata* stromatic, morphologically indistinguishable from the ascomata. *Paraphyses*, when present hyaline, septate, up to 110 μm long, 2.5–6 μm wide at the base tapering to acutely rounded apices, 2–2.5 μm wide at the tip. *Conidiophores* hyaline, smooth, thin-walled, rarely branched at the base, cylindrical, formed from the cells lining the locule wall, 23–35 \times 4–5 μm , or reduced to conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, sub-cylindrical, 6–20 \times 2–5 μm , proliferating percurrently to produce 1–2 annellations or proliferating internally resulting in periclinal thickenings and typical “phialides” (*sensu* Sutton 1980). *Conidia* narrowly fusiform, or irregularly fusiform,

base subtruncate to bluntly rounded, (17–) 19.5–30(–34) \times 4–6(–7.5) μm , 95 % confidence limits of 350 conidia = 25.8–26.5 \times 5.3–5.4 μm (av. \pm S.D. of 350 conidia = 26.2 \pm 3.1 \times 5.4 \pm 0.7 μm), L/W = 4.9 \pm 0.96 with 95 % confidence limits of 4.8–5.0, rarely forming a septum before germination, smooth with granular contents, in some isolates becoming dark-walled and septate with age, (9.5–) 10.5–20(–23) \times (3–)4–6(–6.5) μm (av. \pm S.D. of 150 conidia = 15.5 \pm 2.7 \times 5.1 \pm 0.6 μm). *Spermatophores* hyaline, smooth, occasionally branched, cylindrical to subcylindrical septate, 4–15 \times 1–3.5 μm . *Spermatogenous cells* discrete or integrated, hyaline, smooth, cylindrical, holoblastic or proliferating via phialides with periclinal thickenings, 7–10 \times 2–3 μm . *Spermatia* unicellular, hyaline, allantoid to rod-shaped, 3–6 \times 1.5–2 μm .

Culture characteristics: Colonies oliveaceous becoming grey with reverse black. Mycelial mat moderately dense, margin smooth. Optimum temperature for growth 25(–30) $^{\circ}\text{C}$, colony on $\frac{1}{2}$ PDA reaching 50 mm radius after 4 d at 25 $^{\circ}\text{C}$ in the dark.

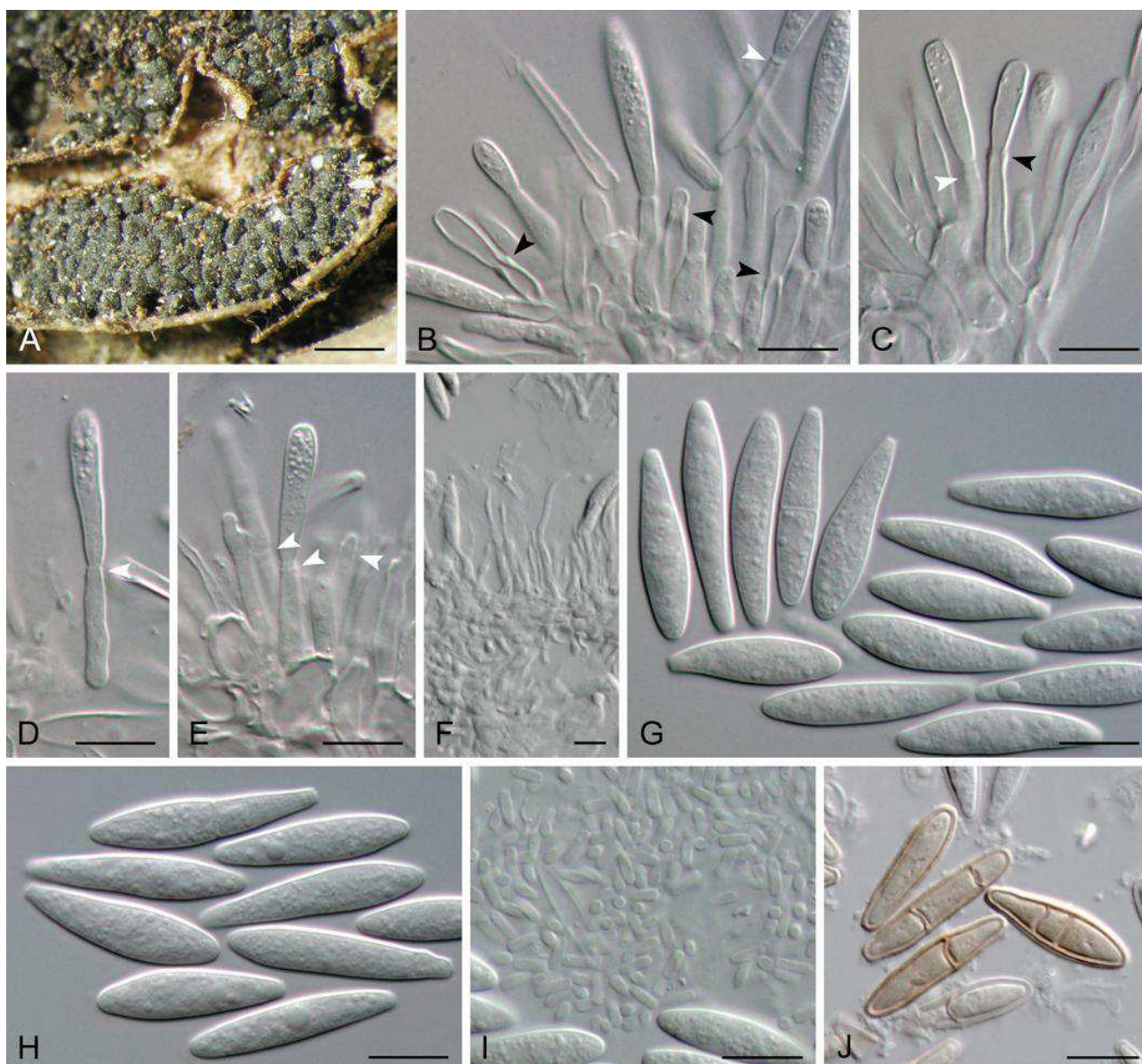


Fig. 12. *Botryosphaeria dothidea*. A. Botryose cluster of conidiomata erumpent through the bark of a poplar twig. B–E. Conidiogenous cells with periclinal thickenings (black arrowheads) or annellations (white arrowheads). F. Paraphyses. G, H. Conidia. I. Spermatia. J. Pigmented, thick-walled, septate conidia. Scale bars: A = 0.5 mm, B–J = 10 μ m.

Type: France, *Rosa* sp., 1823, Fries ex Mougeot. Herbarium S (**neotype** of *Sphaeria dothidea* designated by Slippers *et al.* 2004a). **Switzerland**, Ticino, Crocifisso, *Prunus* sp., Oct. 2000, B. Slippers, PREM 57372 (**epitype** designated by Slippers *et al.* 2004a). **Italy**, on branches of *Aesculus* sp., P.A. Saccardo, PAD, (neotype of asexual morph designated by Crous & Palm 1999).

Cultures: CBS 115476 = CMW 8000 (ex-epitype).

Hosts: Woody plants in numerous families. Reports of hosts prior to 2000 are unreliable because the concept of this species was not clear until Slippers *et al.* (2004a) redefined it and proposed neotype, epitype and ex-epitype cultures. It is highly probable that before that time some of the host associations may have been of species of *Neofusicoccum*. However, some recent reports can confirm the following hosts: *Cistus ladanifer* (Sánchez *et al.* 2002), *Fraxinus*, *Ostrya*, *Prunus*, *Populus*, (Slippers *et al.* 2004a), *Acacia rostellifera*, *Eucalyptus marginata* (Taylor *et al.* 2009) *Vitis vinifera*, *Olea europaea* (Phillips *et al.* 2005, Lazzizzera *et al.* 2008b), *Quercus*

suber, *Q. ilex* (Sánchez *et al.* 2003), *Cistus ladanifer* (Sánchez *et al.*, 2002), *Juniperus communis*, *Acer* sp., *Actinidia deliciosa*, *C. limon*, *Fagus* sp., *Juglans regia*, *Mangifera indica*, *Olea europaea*, *Picea* sp., *Populus nigra*, *Prunus persica*, *Quercus* sp., *Rubus* sp., *Salix* sp., *V. vinifera* (Abdollahzadeh *et al.* 2013).

Known distribution: Probably worldwide and cosmopolitan.

Notes: The description of *S. dothidea* (Fries 1823) refers to a fungus on twigs of *Fraxinus* sp. According to Slippers *et al.* (2004a) the specimen of *S. dothidea* in the Fries collection that has been cited as the holotype (von Arx & Müller 1954) is on what appears to be a *Rosa* sp. and thus cannot be the holotype. Phillips & Lucas (1997) and Slippers *et al.* (2004a) examined the only other specimen of *S. dothidea* in the Fries herbarium and found it to be immature with no spores. Slippers *et al.* (2004a) designated that specimen as the neotype and also designated an epitype (PREM 57372) on *Prunus* sp. collected from Crocifisso, Switzerland, with an ex-epitype culture (CBS 115476 = CMW 8000).

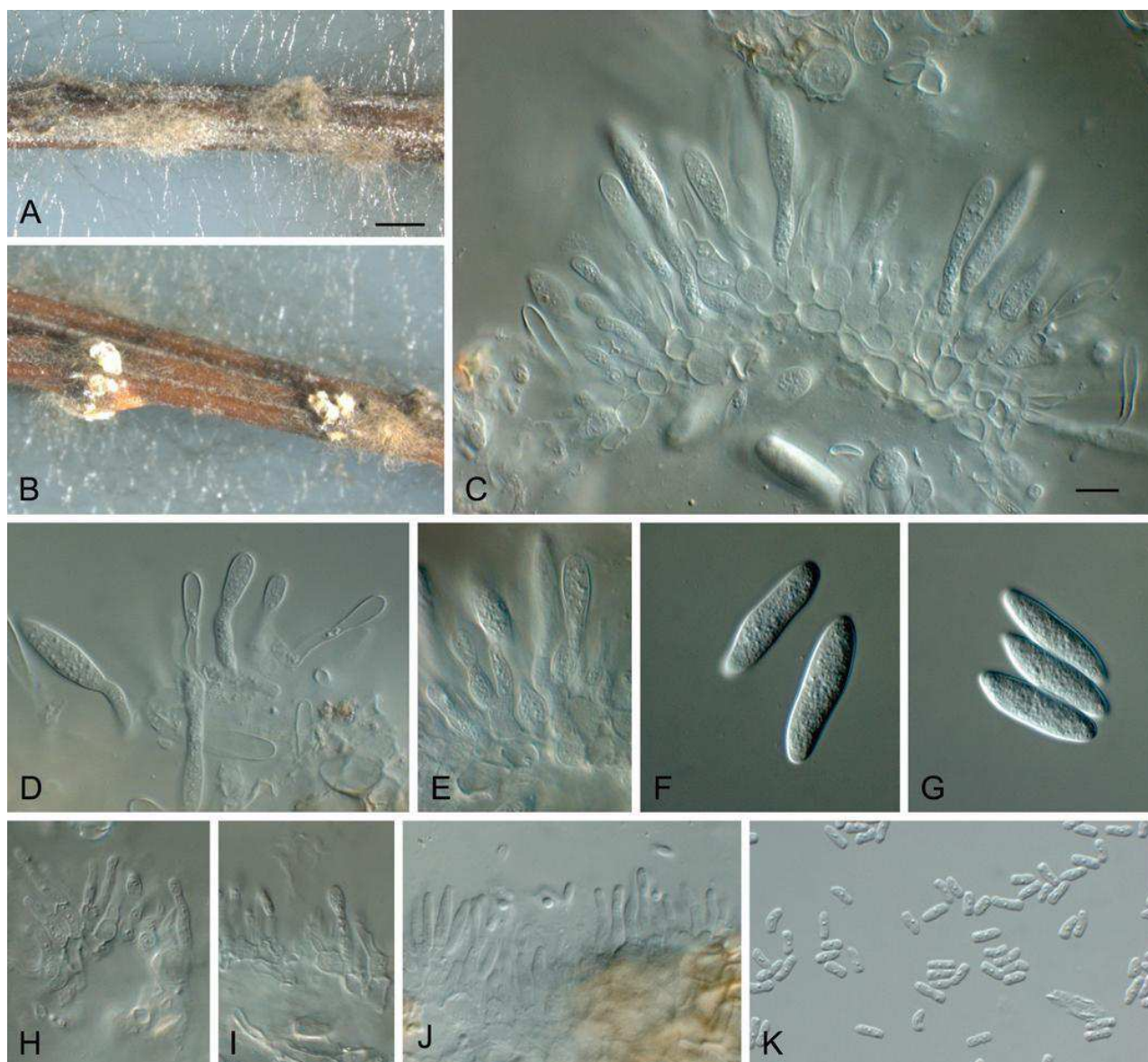


Fig. 16. *Cophiniforma atrovirens*. A, B. Conidiomata formed on pine needles in culture. Conidia are oozing from the conidiomata in B. C–E. Conidiogenous cells. F, G. Conidia. H–J. Spermatogenous cells. K. Spermatia. Scale bars: A = 0.5 mm, C = 10 μ m. Scale bar in A applies to B. Scale bar in C applies to D–K.

University of Wisconsin and these were given the codes 97-58 and 97-59. Zhou & Stanosz (2001) sequenced ITS of these two strains and the sequences are available in GenBank as AF246929 and AF246930. Unfortunately no other sequences were generated and these two isolates have since been lost.

In the ITS phylogeny generated by Mohali *et al.* (2007) isolates from *E. urophylla* and *A. mangium* clustered with the two ex-type isolates of *B. mamane*. However, three base pairs in ITS separate the ex-type isolates of *C. mamane* from the Venezuelan isolates. Furthermore, ITS sequences of the Venezuelan isolates of *C. mamane* are exactly the same as the ITS sequence of *C. atrovirens*. Therefore we consider the Venezuelan isolates to represent *C. atrovirens*.

Diplodia Fr., *In: Mont., Ann. Sci. Nat. Bot., sér. 2, 1: 302. 1834.* MycoBank MB8047.

Type species: Diplodia mutila Fr., *In: Mont., Ann. Sci. Nat. Bot., sér. 2, 1: 302. 1834.*

Ascomata unilocular, solitary or clustered, immersed, partially erumpent when mature, dark brown to black, thick-walled, wall composed of outer layers of thick-walled, dark brown *textura angularis*, inner layers of thin-walled, hyaline *textura angularis*. *Ostiole* central, circular, papillate, periphysate. *Pseudoparaphyses* hyaline, branched, septate. *Asci* clavate, stipitate, bitunicate, containing eight, biserial ascospores. *Ascospores* fusiform, hyaline, thin-walled, smooth, aseptate, rarely becoming light brown and 1–2-septate with age. *Mycelium* immersed or superficial, branched, septate, melanised, dark brown. *Conidiomata* pycnidial, ostiolate, formed in uni- or multiloculate stromata, immersed, becoming erumpent at maturity. *Ostiole* central, circular, papillate. *Paraphyses* lacking. *Conidiophores* (when present) hyaline, simple, occasionally septate, rarely branched, cylindrical, arising from the cells lining the pycnidial cavity. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, cylindrical, determinate or proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings, or proliferating percurrently and forming two or three annellations. *Conidia* initially hyaline, aseptate, thick-walled, becoming 1–2-septate and pale

translucent brown after discharge from the pycnidia, but the colouration is often delayed or never occurs, in some species the conidia become pigmented while still enclosed in the conidioma and in these species the conidia rarely become septate.

Notes: Two distinct conidial morphologies are seen in *Diplodia* species. In one type the conidia are initially hyaline and aseptate

and later become pale to dark brown and 1-septate. Pigmentation is often delayed and in some species dark conidia are never seen. In the other type, the conidia become pigmented at an early stage of development, even while they are still enclosed within the pycnidia. These conidia only rarely become septate. These two morphological groups are supported by two distinct phylogenetic lineages.

Key to *Diplodia* spp.

- | | | |
|-----|--|--|
| 1. | Conidia hyaline and aseptate, becoming brown and 1-septate only with age | 2 |
| 1. | Conidia dark brown and aseptate before discharge from pycnidia | 11 |
| 2. | Av. conidial length greater than 29 μm | 3 |
| 2. | Av. conidial length less than 29 μm | 5 |
| 3. | Conidia 18–22 μm wide | <i>D. tsugae</i> |
| 3. | Conidia not more than 16 μm wide | 4 |
| 4. | On <i>Quercus</i> , av. conidial length 29.9 \times 13.5 μm | <i>D. corticola</i> |
| 4. | On hosts other than <i>Quercus</i> , colonies rosulate | <i>D. rosulata</i> |
| 5. | On <i>Malus</i> , conidia pale brown | <i>D. bulgarica</i> |
| 5. | Conidia hyaline, becoming pigmented and 1-septate with age | 6 |
| 6. | On <i>Cupressus</i> or <i>Juniperus</i> spp. | <i>D. cupressi</i> |
| 6. | On other hosts | 7 |
| 7. | Av. conidial length 28 μm or longer | 8 |
| 7. | Av. conidial length less than 28 μm | 9 |
| 8. | Conidia up to 17 or more μm wide | <i>D. malorum</i> |
| 8. | Conidia never reach 17 μm wide | 10 |
| 9. | On <i>Quercus</i> | <i>D. quercivora</i> |
| 9. | On other hosts | <i>D. africana</i> |
| 10. | Av. conidial length greater than 27 μm (27.7 μm) | <i>D. agrifolia</i> |
| 10. | Av. conidial length less than 27 μm | 11 |
| 11. | Av. conidial size 24.5 \times 12.5 μm , on <i>Olea</i> | <i>D. olivarum</i> |
| 11. | Av. conidial size 25.5 \times 13.5 μm , on other hosts | <i>D. mutila</i> |
| 12. | Av. conidial length greater than 35 μm | 13 |
| 12. | Av. conidial length less than 35 μm | 14 |
| 13. | Conidial length exceeding 50 μm (up to 54 μm) | <i>D. sapinea</i> |
| 13. | Conidial length never exceeding 50 μm (up to 41.5 μm) | <i>D. scrobiculata</i> |
| 14. | Av. conidial length greater than 28 μm | <i>D. intermedia</i> |
| 14. | Av. conidial length less than 28 μm | 15 |
| 15. | Av. conidial length greater than or equal to 25 μm | 16 |
| 15. | Av. conidial length less than 25 μm | <i>D. allocellula</i> |
| 16. | Conidial length never exceeding 30 μm | <i>D. seriata</i> |
| 16. | Conidial length exceeding 30 μm | <i>D. alatafructa</i> / <i>D. pseudoseriata</i> ¹ |

¹These two species cannot be distinguished based on their morphology.

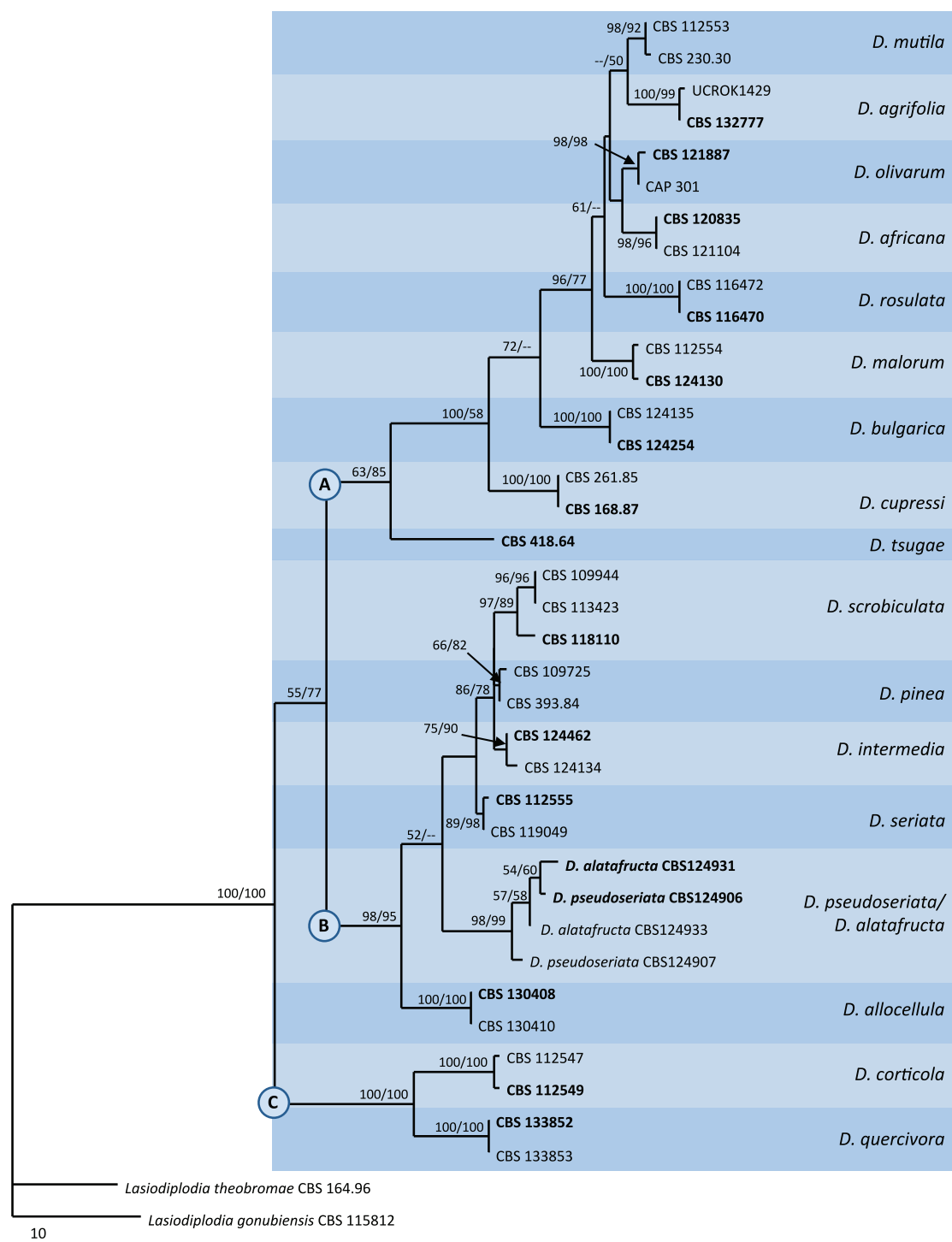


Fig. 17. One of 75 equally most parsimonious trees (tree length = 371, CI = 0.752, RI = 0.673, HI = 0.248) obtained from the combined analysis of ITS and EF1- α sequences from *Diplodia* species. Phylogenetic information contained in alignment gaps was incorporated into the phylogenetic analyses using simple indel coding as implemented by GapCoder (Young & Healy 2003). The phylogenetic tree resulting from ML analysis using the general time reversible model of DNA evolution and assuming a discrete gamma distribution (GTR+G) had a topology identical to the MP tree presented. MP/ML values (> 50 %) resulting from 1000 bootstrap replicates are given at the nodes. The tree was rooted to *Lasiodiplodia theobromae* CBS 164.96 and *Lasiodiplodia gonubiensis* CBS 115812. Clades corresponding to the 17 recognised species within the genus *Diplodia* are highlighted.

DNA phylogeny

Phylogenetic analysis based on combined ITS and EF1- α sequences revealed three major clades, A, B and C (Fig. 17). Most of the species in clade A have hyaline conidia that become pigmented and 1-septate only some time after discharge from the pycnidia. The exception is *D. bulgarica*, which has pale brown

conidia, but these become more darkly pigmented and 1-septate with time. Eleven species can be distinguished in this clade and all are supported by moderate to high bootstrap values. In clade B the species all have conidia that become pigmented soon after they have formed, sometimes while still attached to the conidiogenous cell and usually before discharge from the pycnidia. Only rarely do they become septate. Bootstrap support for some of the species,

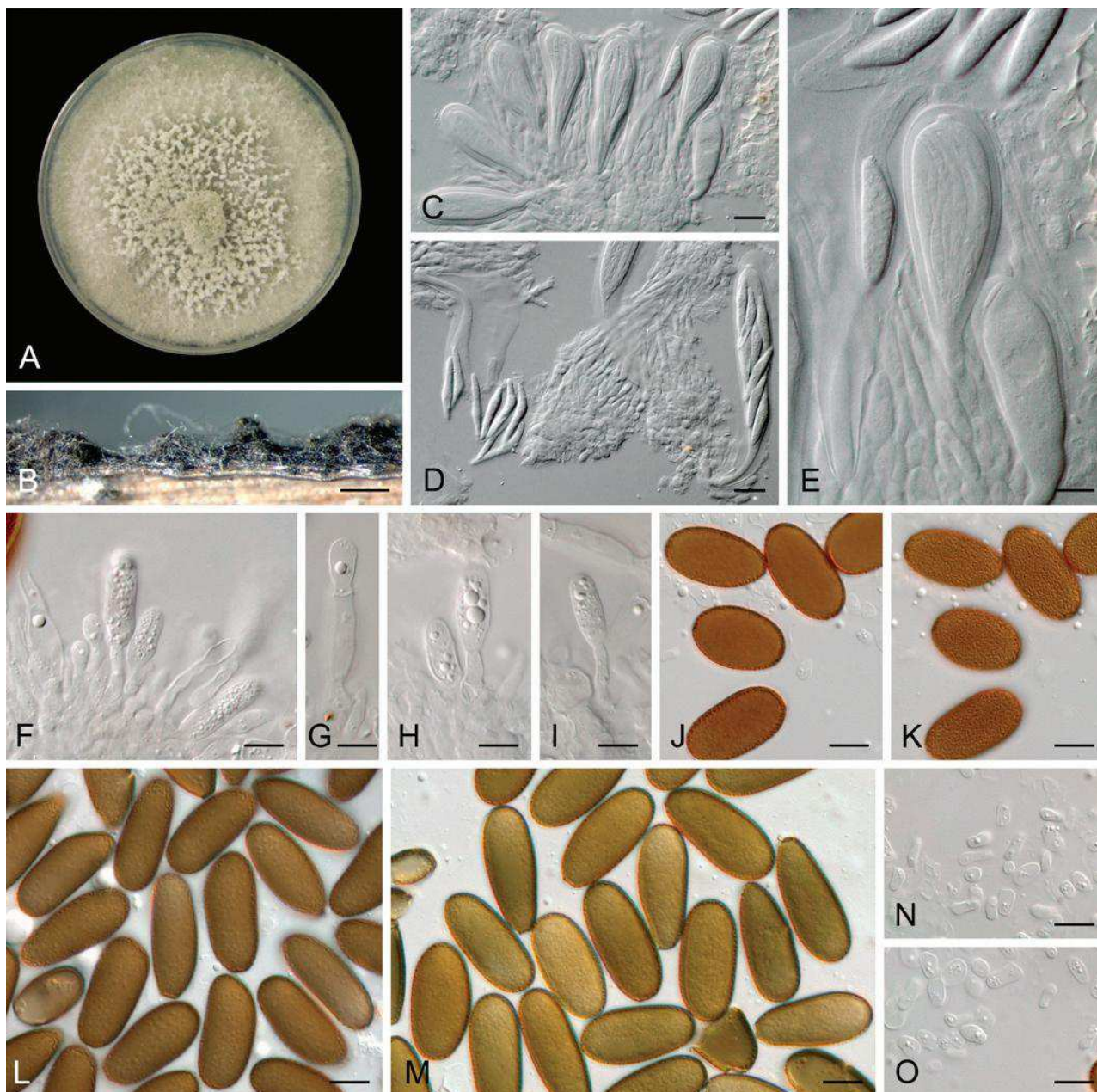


Fig. 22. *Diplodia intermedia*. A. Culture grown on PDA. B. Conidiomata developing on pine needles in culture. C. Asci. D, E. Ascus, ascospores and pseudoparaphyses. F–I. Conidiogenous cells. J, K. Conidia in two focal planes to show finely verruculose inner surface of the wall. L, M. Conidia. N, O. Spermatia. Scale bars: B = 0.5 mm, C, D = 20 µm, E–M = 10 µm, N, O = 5 µm.

Type: **Germany**, Rhineland, on *Malus* sp., 1870, J. Fuckel, Fuckel, Fungi rhenani N° 1706, **holotype** in G, **isotypes** K and M. **Portugal**, Setúbal, Monte da Caparica, *Malus sylvestris*, Feb. 2006, A.J.L. Phillips, **epitype** CBS H-201888.

Culture: CBS 124130 (ex-epitype).

Hosts: *Malus* spp. (Phillips et al. 2012).

Known distribution: Germany, Portugal (Phillips et al. 2012).

Notes: Since the time that it was introduced by Fuckel (1870), the name *D. malorum* has been used infrequently, while the name *D. mutila* was applied to the apple pathogen. However, *D. malorum* is morphologically and phylogenetically distinct from *D. mutila*.

The conidia are larger than those of *D. mutila* and they frequently become brown and 1-septate soon after discharge from the conidioma.

Diplodia mutila (Fr.) Mont., Ann. Sci. nat., sér. 2, 1: 302. 1834. MycoBank MB201741. Fig. 24.

Basionym: *Sphaeria mutila* Fr., Syst. Mycol. (Lundae) 2: 424. 1823.
 ≡ *Physalospora mutila* (Fr.) N.E. Stevens, Mycologia 28: 333. 1936.
 = *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, Canad. J. Bot. 42: 1299. 1964.

Further synonyms are given by Stevens (1933).

Ascomata unilocular, solitary or clustered, immersed, partially erumpent when mature, globose, up to 300 µm diam, dark brown to black, thick-walled, wall composed of outer layers of thick-walled,

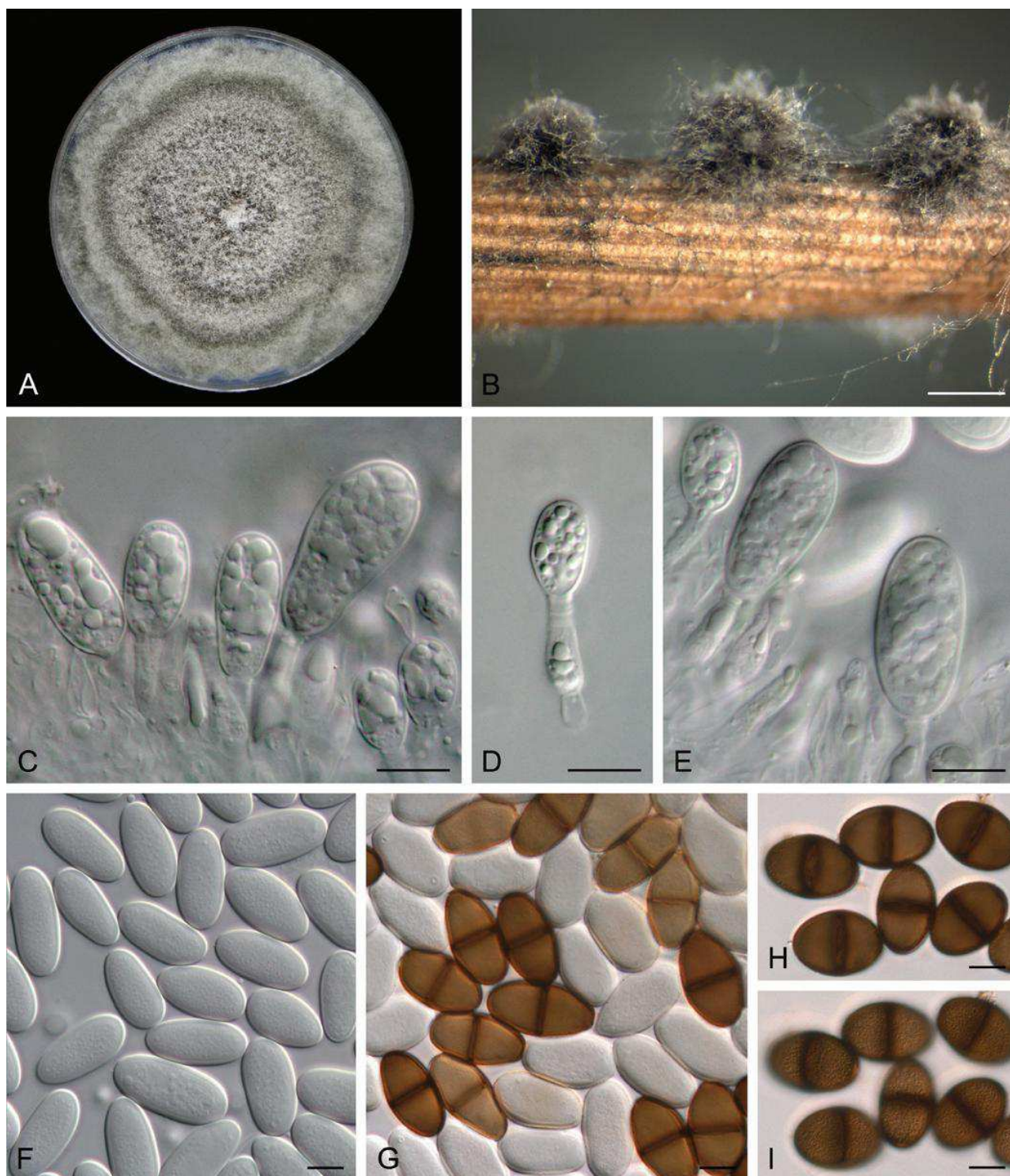


Fig. 23. *Diplodia malorum*. A. Culture growing on PDA. B. Pycnidia formed on pine needles. C–E. Conidiogenous cells. F. Hyaline aseptate conidia. G. Hyaline and 1-septate brown conidia. H, I. Brown conidia at two different planes of focus to show the finely verruculose inner surface of the wall. Scale bars: B = 500 μ m, C–I = 10 μ m.

dark brown *textura angularis*, inner layers of thin-walled, hyaline *textura angularis*. *Ostiole* central, circular, papillate, periphysate. *Pseudoparaphyses* hyaline, branched, septate, 2–3 μ m wide. *Asci* clavate, stipitate, bitunicate, containing eight, biseriate ascospore, 100–160 \times 14–22 μ m (including stipe). *Ascospores* fusiform, widest in the middle, both ends obtuse, hyaline, thin-walled, smooth, aseptate, rarely becoming light brown and 1–2-septate with age, (24.5–)28–35(–36) \times (9.5–)10–13(–13.5) μ m, 95 % confidence

limits = 30.8–32.1 \times 11.2–11.7 μ m (av. \pm S.D. of 50 ascospores = 31.5 \pm 2.3 \times 11.4 \pm 0.9 μ m), L/W = 2.8. *Conidiomata* solitary or aggregated in clusters of up to five or more, immersed, partially erumpent when mature, dark brown to black, more or less globose, up to 600 μ m diam, wall composed of three layers, an outer of dark brown, thick-walled *textura angularis*, a middle layer of dark brown thin-walled cells, an inner layer of thin-walled hyaline cells. *Ostiole* central, circular, papillate. *Conidiophores* absent.

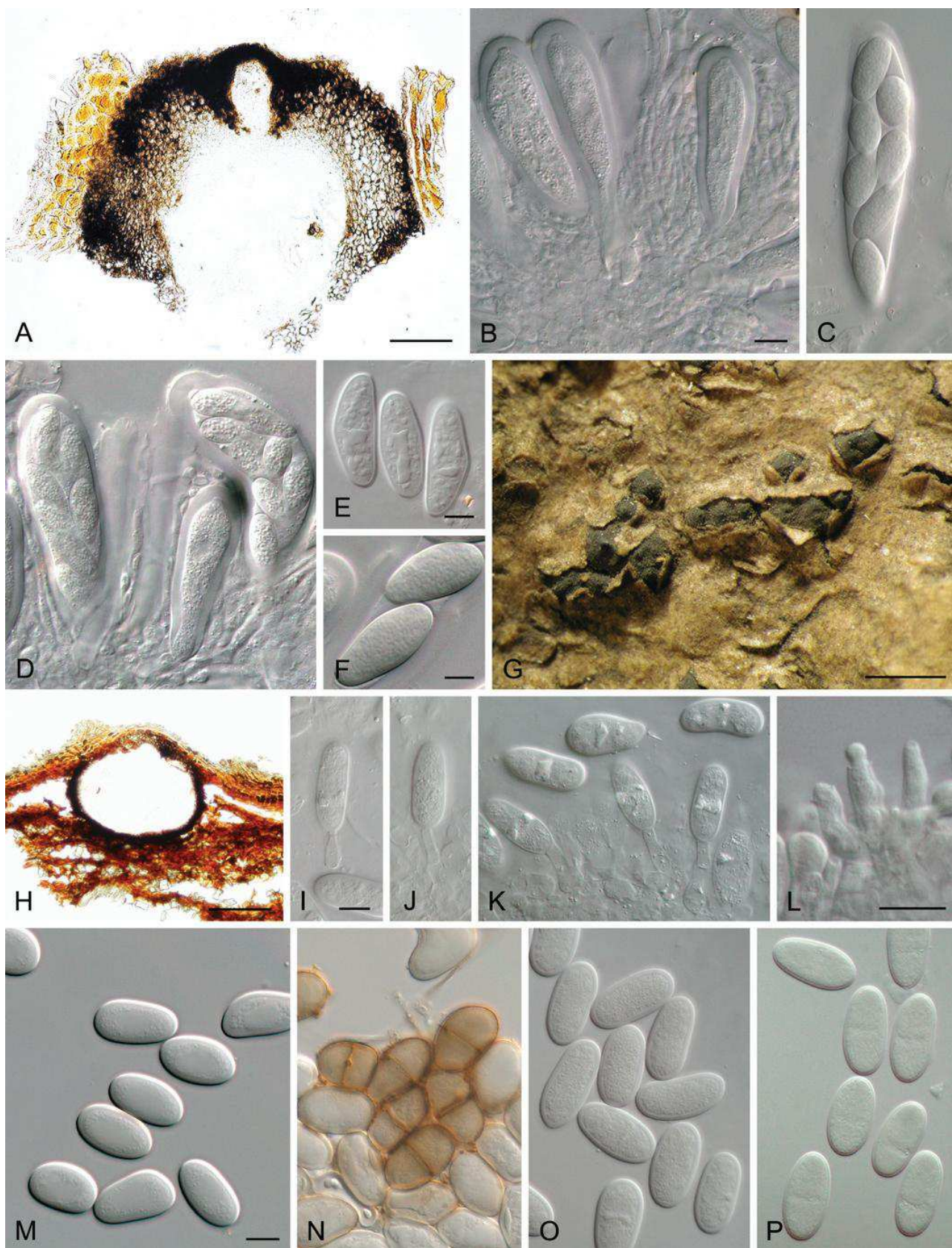


Fig. 24. *Diplodia mutila*. A. Sectioned ascoma. B. Immature asci and pseudoparaphyses. C, D. Asci with ascospores. E, F. Ascospores. G. Conidiomata partially erumpent through host. H. Sectioned conidioma. I–L. Conidiogenous cells. M–P. Conidia. M. Hyaline, aseptate conidia of CBS 112553. N. Pale brown, 1-septate conidia of CBS 112553. O. Hyaline, aseptate conidia of BPI 599153. P. Hyaline, aseptate conidia of K(M) 99664. Scale bars: A = 100 μ m, B = 10 μ m, E, F = 10 μ m, G = 500 μ m, H = 100 μ m, I, L = 10 μ m, M = 10 μ m. Scale bar in B applies to C, D. Scale bar in I applies to J, K. Scale bar in M applies to N–P.

Conidiogenous cells holoblastic, discrete, cylindrical, hyaline, smooth, indeterminate, proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings, or proliferating percurrently to form one or two indistinct annellations, 11–15 × 4–5 µm. *Conidia* hyaline, aseptate, smooth, thick-walled, oblong to ovoid, straight, both ends broadly rounded, rarely becoming pale brown and septate when aged, (23.5–)24.5–27(–27.5) × (12.5–)13–14(–14.5) µm, 95 % confidence limits = 25.1–25.7 × 13.2–13.5 µm (av. ± S.D. of 50 conidia = 25.4 ± 1.0 × 13.4 ± 0.5 µm), L/W ratio = 1.9.

Type: of *Physalospora mutila* (designated by Alves *et al.* 2004): **UK**, England, Cornwall, Saltash, on bark of *Malus* sp., 22 Aug. 1935, N.E. Stevens, *lectotype* BPI 599153. Of *Diplodia mutila*: **France**, Ardenne, Sedan, on bark of *Populus nigra*, date unknown, Montagne sp., **isotype** K(M)99664.

Cultures: No ex-type, or authentic cultures of either state are known. CBS 112553 has been regarded, unofficially, as a standard isolate of *D. mutila* (Alves *et al.* 2004, Damm *et al.* 2008).

Hosts: While Farr *et al.* (2013) list 55 hosts for *D. mutila* it is now clear that many of the earlier reports of this fungus could be misidentifications (Alves *et al.* 2004, Alves *et al.* 2006, Lazzizzera *et al.* 2008, Phillips *et al.* 2012). The following are confirmed hosts: *Chamaecyparis lawsoniana*, *Fraxinus*, *Malus*, *Populus*, *Taxus baccata*, *Vitis vinifera*.

Known distribution: England, France, Italy, Portugal, South Africa, USA (California).

Notes: The taxonomic history of *D. mutila* and the controversy surrounding the characters that define this fungus have been explained by Sutton (1980) and Alves *et al.* (2004). However, in the interests of presenting a comprehensive analysis, these explanations are repeated here.

Fries (1823) described *Sphaeria mutila* and distributed two exsiccati under that name as *Scler. Suec.* 164 and 385. Alves *et al.* (2004) examined material of these two exsiccati in STR and found both to be devoid of spores. Stevens (1933) and Sutton (1980) also reported that these two exsiccati in BPI and K had no spores. Sutton (1980) reported that 164 was an ascomycete of the *Botryosphaeria* type and pointed out that *Sphaeria mutila* should be adopted for the ascomycetous element it represents. Montagne sent Fries a fungus that was identified as *S. mutila*. The record was listed under *S. mutila* Fr. by Montagne (1834) with the note that this species would become the type of a new genus, *Diplodia*, later characterised by Fries (1849). Therefore, the name of the pycnidial fungus dates from Montagne (1834); it is typified by his material and the correct citation is *Diplodia mutila* Fr. in Montagne (1834).

Montagne distributed this fungus in his exsiccatus No. 498. According to Françoise Deluzarche of the Institut de Botanique, Strasbourg, France, no material of this could be found in STR (Alves *et al.* 2004). However, according to Alves *et al.* (2004), Montagne's specimen of *D. mutila* in Kew, K(M)99664 (isotype), agrees in all aspects with Stevens' (1933) account of Montagne's exs. 498 but differs from the description given by Sutton (1980). While Sutton (1980) referred to the conidia as initially hyaline with a large central guttule, later becoming dark brown and medianly one eusepate, Alves *et al.* (2004) reported that the vast majority of conidia in K(M)99664 are hyaline and aseptate, although pale brown and one- or two-septate conidia are seen rarely. The conidia usually have a large central guttule. Furthermore, the dimensions that Sutton (1980)

reported (27–31 × 12–13.5 µm) are somewhat larger than Alves *et al.* (2004) found (23.5–27.5 × 12–14 µm). Stevens (1933) reported the conidia as (20–)25–27 × 10–12(–16) µm.

In the original description, Montagne (1834) described the conidia as "Asci [conidia] elliptico-oblongi, didymi, sporidiis binis referti." Stevens (1933) studied slides of Montagne's exsiccatus in STR and described the conidia as hyaline and aseptate with a thick smooth, glassy wall, although pale brown, 1-septate conidia sometimes were present. Both Shoemaker (1964) and Laundon (1973) agreed with Stevens' concept. Sutton (1980), however, described the conidia as hyaline at first but becoming dark brown and 1-septate when mature. In his illustration of this species he depicts a predominance of dark conidia. Alves *et al.* (2004) re-examined the isotype in K and concluded that the conidia are predominantly hyaline, although some are dark and 1-septate. The consensus was that conidia of *D. mutila* are (20–)25–27.5 × 10–12 µm (Stevens 1933, Shoemaker 1964, Laundon 1973, Sivanesan 1984), but Sutton (1980) considered they can be up to 31 µm long.

Stevens (1936) reported on the sexual morph of *D. mutila* that he found on apple and ash in England. The connection between this fungus and *D. mutila* was established through single ascospore isolations and Stevens applied the name *Physalospora mutila* (Fr.) N.E. Stevens. Shoemaker (1964) considered this to be a species of *Botryosphaeria* and applied the new name *B. stevensii* Shoemaker because the name *Botryosphaeria mutila* was already taken. Stevens (1936) referred to a specimen on cut sticks of *Fraxinus excelsior* as the type.

When Alves *et al.* (2004) examined the type specimen of *P. mutila* in BPI 599151 they could find no ascomycete. There was, however, ample material of the sexual morph on BPI 599153, which is a specimen of *P. mutila* on apple collected by Stevens from the same locality and at the same time that he collected BPI 599151. Since this specimen conformed in all ways with the protologue, Alves *et al.* (2004) designated this specimen as lectotype. Unfortunately, no ex-type cultures exist. The type host of *P. mutila* is *Fraxinus excelsior* whereas the type host of *Diplodia mutila* is a *Populus* sp.

Diplodia olivarum A.J.L. Phillips, Frisullo & Lazzizzera, *Fungal Divers.* 31: 67. 2008. MycoBank MB511402. Fig. 25.

Ascomata not reported. *Conidiomata* pycnidial, stromatic, produced on pine needles on WA after 7–14 d, solitary, globose to ovoid, dark brown to black, up to 150 µm wide, wall composed of dark brown, thick-walled *textura angularis*, becoming thin-walled and hyaline towards the inner region, semi-immersed to erumpent, unilocular, with a short neck. *Ostiole* circular, central. *Conidiophores* hyaline, cylindrical, 10–15 × 3.5–5 µm. *Conidiogenous cells* hyaline, cylindrical, holoblastic forming a single conidium at the tip, proliferating internally to form periclinal thickenings or proliferating percurrently giving rise to 2–3 annellations, 8–12 × 3–6 µm. *Conidia* hyaline, aseptate, smooth, thick-walled, oblong to oval, widest in the middle, apex broadly rounded, base rounded or truncate, rarely becoming pale brown, internally verruculose, 1-septate after discharge from the pycnidia, (21.5–)22–27.5(–28.5) × (10–)11–13.5(–14.5) µm, 95 % confidence limits = 23.9–24.8 × 12.2–12.7 µm, av. ± S.D. = 24.4 ± 1.6 × 12.4 ± 1 µm, L/W = 2.0.

Type: **Italy**, Puglia, Lecce, Scorrano, Basco Belvedere, on rotting drupes of *Olea europaea*, Dec. 2004, S. Frisullo, **holotype** CBS H-19914.

separate, irregularly multilocular, walls composed of small-celled, pale brown, thin-walled *textura angularis*, becoming hyaline towards the conidiogenous region. Dehiscence irregular. *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, determinate, discrete, cylindrical, tapered markedly or gradually towards the apices, hyaline, smooth, thin-walled, formed from the walls of the locules. *Conidia* aseptate, pyriform to limoniform, dark brown, thick-walled, smooth, base often protruding and papillate, often with a central guttule and a single germ slit.

Notes: *Endomelanconiopsis* was introduced by Rojas *et al.* (2008) for *E. endophytica* and *E. microspora*. The genus is similar to *Endomelanconium* Petrak but belongs to the *Botryosphaeriaceae* and the conidia are non-papillate. Only two species are currently known in culture and the main difference between them is that chlamydospores are abundant in *E. microspora* but absent in *E. endophytica*.

Species descriptions

Endomelanconiopsis endophytica Rojas & Samuels, *Mycologia* 100: 770. 2008. MycoBank MB511838. See Rojas *et al.* (2008) for illustrations.

Conidiomata stromatic, scattered throughout colony, varying from globose to cylindrical, 1–3 cylindrical necks, superficial or immersed in the agar; often cylindrical papillae protruding from the agar in groups of a few; wall composed of pale brown and black angular cells, becoming hyaline and more hyphal toward the conidiogenous cells; locule convoluted, completely lined with conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* formed from the inner cells all over the conidiomata wall, discrete, determinate, cylindrical, tapered toward the apex, hyaline, holoblastic, rarely with a single percurrent proliferation, 7.5–23.5 × 1–3.5 µm at apex, 1.5–4 µm at base (av. = 14.2 × 1.6 µm at apex, 14.2 × 2.2 µm at base). *Conidia* ellipsoidal to limoniform, apex rounded, base flat to rounded, aseptate, hyaline when immature, dark brown with a single longitudinal slit three-quarters of the length of the conidia when mature, (4.5–)5.5–7.5(–10) × (3–)3.5–4.5(–6) µm. *Spermatia* forming in the same locules as conidia from densely arranged, enteroblastic, phialidic conidiogenous cells, appearing to arise from the inner cells of the conidioma wall, ellipsoidal to allantoid, formed on PDA and SNA, 2–7(–10) × (1–2(–3) µm. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics: Colonies at first colourless with hyaline immersed hyphae, after 4 d colonies olivaceous in center and concentric rings with irregular shape, after 10 d aerial mycelium dense dark olivaceous or grey or shiny black with little aerial mycelium. Optimum temperature at 30–37 °C; colony radius 43–55 mm after 5 d on PDA.

Type: Panama, Nombre de Dios, isolated from leaves of *Theobroma cacao*, 2000, E. Rojas, L. Mejía & Z. Maynard, **holotype** BPI 878370.

Culture: CBS 120379 (ex-type).

Hosts: *Heisteria concinna*, *Theobroma cacao* (Rojas *et al.* 2008).

Distribution: Panama (Rojas *et al.* 2008).

Notes: The germ slit in the conidia of *E. endophytica* and *E. microspora* is an unusual feature in the *Botryosphaeriaceae*. While *Neodeightonia subglobosa* was reported to have conidia with germ slits (Punithalingam 1969), and these were interpreted by Crous *et al.* (2006) as striations similar to those seen in *Lasiodiplodia*.

Endomelanconiopsis microspora (Verkley & Aa) E.I. Rojas & Samuels, *Mycologia* 100: 772. 2008. MycoBank MB511839.

Basionym: *Endomelanconium microsporum* Verkley & Aa, *Mycologia*, 89: 967. 1997.

Conidiomata stromatic, solitary and globose to subglobose, or convoluted with merging cavities, superficial or immersed in the agar, at first pale olivaceous, later black, glabrous, often with an apical papilla but seldom a functional ostiole, mostly dehiscing by bursting or partial dissolution of upper wall tissue, 200–500 µm diam. *Conidiomatal wall* composed of two layers, an outer layer of brown to olivaceous *textura epidermoidea-angularis*, and an inner layer variable in thickness of hyaline *textura angularis-globulosa*. *Conidiogenous cells* formed from the inner cells all over the conidiomatal wall, discrete, determinate, cylindrical, but tapering towards the apex, hyaline, holoblastic, rarely with a single percurrent proliferation, mostly 6–10 × 5–7 µm. *Conidia* ellipsoidal to pyriform, apex rounded, base with an inconspicuous scar, aseptate, smooth, hyaline when liberated, soon becoming dark brown with a single longitudinal hyaline slit, containing one large and a few smaller oil droplets, (4.5–)5.5–6.5(–7) × (3.5–)4–4.5 µm. *Chlamydospores* abundant in immersed mycelium, intercalary and terminal, when intercalary, subglobose to fusiform, single or catenate (2–5), when terminal, globose to clavate-pyriform, occasionally with a small basal, apophysis-like cell or an apical papilla, thick-walled, brown, often verruculose, filled with oil droplets, mostly 9–17 × 6–10 µm. In older cultures additional chlamydospores forming in basipetal succession behind the terminal ones.

Type: Papua New Guinea, Central Province, 22 km E of Port Moresby, Varirata National Park near Varirata Lookout, soil in dry secondary forest with *Casuarina* and *Eucalyptus*, and conglomerate rock outcrops, 23 Oct. 1995, A. Aptroot, H.A. van der Aa 12183 (a dried culture on oatmeal agar), **holotype** CBS H-12183.

Culture: CBS 353.97 (ex-type).

Substrate: Soil (Verkley & van der Aa 1997).

Known distribution: Papua New Guinea (Verkley & van der Aa 1997).

Note: *Endomelanconiopsis microspora* is characterised by having stromatic conidiomata that give rise to brown, aseptate conidia, and abundant terminal, and intercalary chlamydospore-like structures that are formed in culture (Verkley & van der Aa 1997).

Lasiodiplodia Ellis & Everh., *Bot. Gaz.* 21: 92. 1896. MycoBank MB8708.

Type species: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl., *Bull. trimest. Soc. Mycol. Fr.* 25: 57. 1909.

Mycelium immersed or superficial, branched, septate, dark brown. *Ascomata* eustromatic, dark brown to black, uniloculate with thick pseudoparenchymatic wall, ostiolate, embedded in the substrate and partially erumpent at maturity. *Pseudoparaphyses* hyaline, septate. *Asci* bitunicate with thick endotunica and well-developed apical chamber, clavate, stipitate, 8-spored. *Ascospores* irregularly biseriate, initially hyaline, becoming dark brown, aseptate. *Conidiomata* stromatic, immersed or superficial, separate or aggregated and confluent, globose, dark brown, uni- or multilocular; wall of dark brown, thick-walled *textura angularis*, paler and thinner-walled towards the conidiogenous region, often with dark brown superficial hyphae over the surface. *Ostiole* central, single, papillate. *Conidiophores* often reduced to conidiogenous cells, if present hyaline, simple, sometimes septate, rarely branched, cylindrical, arising from the inner layers of cells lining the locules. *Conidiogenous cells* hyaline, smooth, cylindrical to subobpyriform, holoblastic, discrete, determinate or indeterminate and proliferating percurrently with one or two distinct annellations, or proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings, formed from cells lining the inner wall of the conidiomata. *Conidia* hyaline when young, later becoming medianly 1-euseptate, dark brown with longitudinal striations, thick-walled, oblong to ellipsoid, straight, broadly rounded at the apex, base truncate. *Paraphyses* hyaline, cylindrical, septate.

Notes: *Lasiodiplodia* was introduced by Ellis in 1894 with *L. tubericola* as the type species. Although Ellis did not describe it, Clendenin (1896) provided a description of the genus and the species, attributing both to Ellis and Everhardt. Griffin & Maublanc

(1909) considered that on account of the pycnidial paraphyses, the cocoa pathogen, *Botryodiplodia theobromae*, was more suitably accommodated in *Lasiodiplodia*. Since the epithet *theobromae* (1892) is older than *tubericola* (1896), *L. theobromae* should be regarded as the type species of *Lasiodiplodia*. Unfortunately, neither Patouillard (1892) nor Clendenin (1896) referred to any type or other specimens of the genus or species. Pavlic *et al.* (2004) could not locate the types, and they also could not find any specimens from the original hosts or origins.

It has been thought that *Lasiodiplodia* could represent a possible synonym of *Diplodia* (Denman *et al.* 2000). However, phylogenetic studies by Zhou & Stanosz (2001), Slippers *et al.* (2004) and Phillips *et al.* (2008) show that it clusters separately from *Diplodia*. On account of the phylogenetic and morphological differences there is no reason to consider the two as synonymous. Morphologically the two genera are also clearly distinct. Thus, striations on the conidia distinguish *Lasiodiplodia* from *Diplodia*, the conidiomatal paraphyses distinguish it from *Neodeightonia*, which also has striate conidia. Although *Barriopsis* has striate conidia, they are unique in the *Botryosphaeriaceae* because they are also present on immature, hyaline conidia. The sexual morph has been reported only for *L. theobromae*, but the connection with the asexual morph has not been confirmed (see notes under *L. theobromae*). While 27 species names are listed in MycoBank, only 18 species are currently known in culture and all, except *L. theobromae*, have been introduced since 2004. Species can be differentiated based on conidial morphology (especially dimensions) and morphology of the paraphyses.

Key to *Lasiodiplodia* spp.

- 1. Conidia sub-globose, L/W ratio less than 1.5 2
- 1. Conidia ellipsoidal to ovoid, L/W ratio greater than 1.5 3
- 2. Conidia 13.5–21.5 × 10–14 µm (av. length 17.5 µm) *L. mahajangana*
- 2. Conidia 12–19 × 10–12.5 µm (av. length 15.3 µm) *L. margaritacea*
- 3. L/W ratio greater than 2.0 4
- 3. L/W ratio less than 2.0 5
- 4. Conidia 26–33 × 12–15 µm (av. length 28.4 µm) *L. venezuelensis*
- 4. Conidia 17–23 × 8–11 µm (av. length 19.5 µm) *L. viticola*
- 5. Longest paraphyses more than 100 µm long 6
- 5. Longest paraphyses less than 100 µm long 9
- 6. Average conidial length less than 25 µm 7
- 6. Average conidial length greater than 25 µm 8
- 7. Average conidial width = 13 µm *L. iraniensis*
- 7. Conidia average width = 11.5 µm *L. parva*
- 8. Conidia 22–35 µm long (av. 29.6 µm), L/W ratio = 1.9 *L. plurivora*
- 8. Conidia 20–31 µm long (av. 24.5 µm), L/W ratio = 1.6 *L. citricola*
- 9. Average width of conidia less than 16 µm 10
- 9. Average width of conidia 16 µm or more 15
- 10. Conidia small, mostly less than 25 µm long 11
- 10. Conidia large, mostly longer than 25 µm, up to 30 µm or more 14

| | |
|---|----------------------------|
| 11. Average width of conidia less than 10 µm | 12 |
| 11. Average width of conidia greater than 10 µm | 13 |
| 12. Length of paraphyses up to 15, conidia up to 17.5 µm | <i>L. lignicola</i> |
| 12. Length of paraphyses up to 55, conidia up to 21 µm | <i>L. missouriana</i> |
| 13. Paraphyses up to 55 µm long, conidial L/W ratio = 2 | <i>L. egypticae</i> |
| 13. Paraphyses up to 85 µm long, conidial L/W ratio = 1.7 | <i>L. hormozganensis</i> |
| 14. Conidiomata dark brown to black | <i>L. theobromae</i> |
| 14. Conidiomata reddish-purple | <i>L. rubropurpurea</i> |
| 15. Conidia not exceeding 35 µm long | 16 |
| 15. Conidia up to 39 µm long | 17 |
| 16. Paraphyses mostly septate | <i>L. crassispora</i> |
| 16. Paraphyses mostly aseptate | <i>L. pseudotheobromae</i> |
| 17. Paraphyses up to 95 µm long | <i>L. gilanensis</i> |
| 17. Paraphyses not exceeding 65 µm, never reaching 95 µm | <i>L. gonubiensis</i> |

DNA phylogeny

Combined analysis of ITS and EF1- α separates the 18 species currently recognised in this genus (Fig. 36). Some of the species, such as *L. citricola* / *L. parva* / *L. hormozganensis*, are distinguishable mainly from differences in their EF1- α sequences. Furthermore, bootstrap support for some of the inner branches is quite low. This would suggest that a reappraisal of the species in *Lasiodiplodia* based on more gene loci should be undertaken.

Lasiodiplodia citricola Abdollahz., Javadi & A.J.L. Phillips, *Persoonia* 25: 4. 2010. MycoBank MB16777. Fig. 37.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, produced on pine needles on WA within 2–4 wk, superficial, dark brown to black, covered with dense mycelium, mostly uniloculate, up to 2 mm diam, solitary, globose, thick-walled, non-papillate with a central ostiole. *Paraphyses* hyaline, cylindrical, thin-walled, initially aseptate, becoming up to 1–5 septate when mature, occasionally branched, rounded at apex, occasionally basal, middle or apical cells swollen, up to 125 µm long, 3–4 µm wide. *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, discrete, hyaline, smooth, thin-walled, cylindrical, proliferating percurrently with 1–2 annellations, 11–16 × 3–5 µm. *Conidia* initially hyaline, aseptate, ellipsoid to ovoid, with granular content, both ends broadly rounded, wall < 2 µm, becoming pigmented, verruculose, ovoid, 1-septate with longitudinal striations, (20–)22–27(–31) × (11–)12–17(–19) µm, 95 % confidence limits = 24.1–24.9 × 15–15.7 µm (av. ± S.D. = 24.5 ± 0.2 × 15.4 ± 1.8 µm, L/W ratio = 1.6).

Culture characteristics: Colonies with abundant aerial mycelia reaching to the lid of Petri plate, aerial mycelia becoming smoke grey to olivaceous-grey or iron-grey at the surface and greenish grey to dark slate blue at the reverse after 2 wk in the dark at 25 °C. Colonies reaching 85 mm on MEA after 2 d in the dark at 25 °C. Cardinal temperatures for growth: min ≤ 10 °C, max ≥ 35 °C, opt 25–30 °C.

Type: Iran, Gilan Province, Chaboksar, on twigs of *Citrus* sp., Jun. 2007, J. Abdollahzadeh & A. Javadi, **holotype** IRAN 14270F.

Cultures: IRAN 1522C = CBS 124707 (ex-type), IRAN 1521C = CBS 124706.

Hosts: *Citrus* sp. (Abdollahzadeh *et al.* 2010), *Juglans regia* (Chen *et al.* 2013).

Known distribution: Iran (Chaboksar, Gilan Province; Sari, Mazandaran Province; Northern Iran) (Abdollahzadeh *et al.* 2010), USA (California) (Chen *et al.* 2013).

Notes: Phylogenetically, *Lasiodiplodia citricola* is closely related to *L. parva*, but conidia of *L. citricola*, (20–)22–27(–31) × (11–)12–17(–19) µm, are longer and wider than those of *L. parva* (15.5–)16–23.5(–24.5) × (10–)10.5–13(–14.5) µm. In terms of morphology it resembles *L. plurivora* but on average the conidia of *L. citricola* (av. length = 24.5 µm) are shorter than those of *L. plurivora* (av. length = 29.6 µm). This species produces a pink pigment in PDA cultures at 35 °C.

Lasiodiplodia crassispora T.I. Burgess & Barber, *Mycologia* 98: 425. 2006. MycoBank MB500235. Fig. 38.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, superficial, mostly solitary, conical, smooth, iron grey, 0.5–1 mm diam. *Paraphyses* cylindrical, septate, hyaline (21–)30–62(–66) × 2–3.5(–4) µm (av. of 50 paraphyses = 45.7 × 2.7 µm). *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, subcylindrical to cylindrical to ampulliform, proliferating percurrently, (6–)8–16(–19) × 3–7 µm (av. of 50 conidiogenous cells = 11.8 × 5 µm). *Conidia* produced in culture initially hyaline, unicellular, ellipsoid to obovoid, thick-walled (2–3 µm, av. of 50 conidia = 2.6 µm) with granular content, round at apex, occasionally truncate at base, becoming pigmented with one septum when mature or before germination, developing longitudinal striations when mature, 27–30(–33) × 14–17 µm (av. ± S.D. = 28.8 × 16.0 µm, L/W ratio = 1.8).

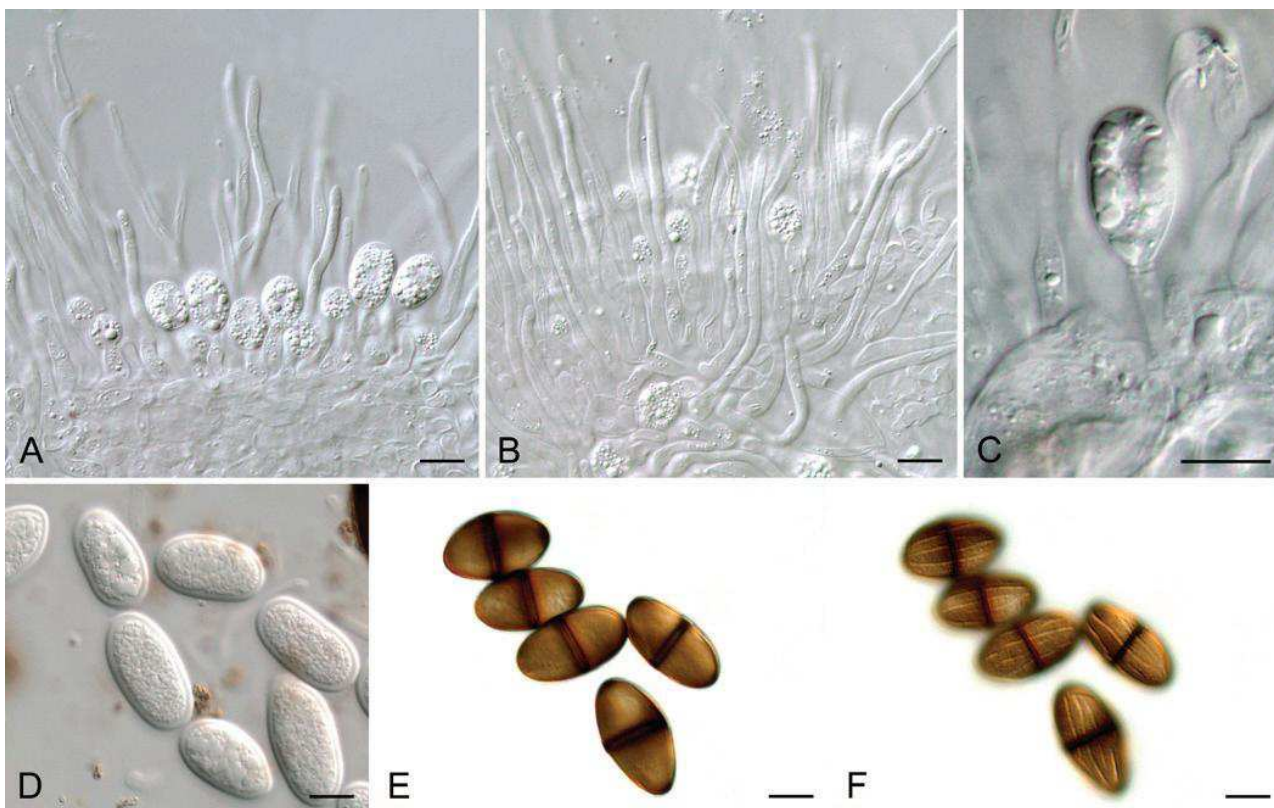


Fig. 45. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. A. Conidiogenous layer with developing conidia and paraphyses. B. Paraphyses. C. Conidium developing on an annellid conidiogenous cell. D. Immature, hyaline conidia. E, F. Mature, dark-walled, one-septate, striate conidia in two different focal planes to show the striations on the inner side of the wall. Scale bars = 10 µm.

Known distribution: Costa Rica, Netherlands, Suriname, Zaire (Alves *et al.* 2008).

Notes: This species can be separated from its closest relatives, *L. citricola*, *L. egypticae*, *L. hormozganensis* and *L. parva* and as previously mentioned under *L. plurivora*. In terms of morphology it is close to *L. crassispora* but the two species differ in that the pseudoparaphyses of *L. crassispora* are mostly septate, while in *L. pseudotheobromae* they are mostly aseptate.

Lasiodiplodia rubropurpurea Burgess, Barber & Pegg, *Mycologia* 98: 431. 2006. MycoBank MB500236. See Burgess *et al.* (2006) for illustrations.

Ascomata not reported. **Conidiomata** stromatic, superficial, globose, red to dark vinaceous, mostly solitary, 0.5–1.5 mm diam and covered with mycelium. **Paraphyses** cylindrical, aseptate, hyaline (30–)32–52(–58) × 1.5–3.5 µm (av. of 50 paraphyses = 42.4 × 2.6 µm). **Conidiophores** reduced to conidiogenous cells. **Conidiogenous cells** holoblastic, hyaline, subcylindrical to ampulliform, 7–13(–15) × 3–5 µm (av. of 50 conidiogenous cells = 10.2 × 4 µm), proliferating percurrently with a single annellation. **Conidia** initially hyaline, unicellular, ellipsoid to obovoid, thick-walled (1 µm) with granular contents, rounded at apex, occasionally truncate at base, initially hyaline and unicellular, becoming pigmented with one septum when mature or before germination, longitudinal striations observed at maturation, 24–33 × 13–17 µm (av. of 100 conidia = 28.2 × 14.6 µm, L/W ratio = 1.9).

Culture characteristics: Colonies moderately dense, with appressed mycelial mat, colonies initially white to buff turning to pale olivaceous-grey within 7 d and becoming darker with age. After 7 d submerged mycelia olivaceous-grey, becoming black with age. Optimum temperature for growth 25–30 °C, reaching 76 mm on PDA after 3 d at both 25 °C and 30 °C in the dark.

Type: Australia, Queensland, Tully, from canker on *Eucalyptus grandis*, May 2003, T.I. Burgess, **holotype** MURU 409.

Cultures: WAC12535 = CMW 14700 = CBS 118740 (ex-type), WAC12536 = CMW 15207.

Host: *Eucalyptus grandis* (Burgess *et al.* 2006).

Known distribution: Australia (Queensland) (Burgess *et al.* 2006).

Note: The red-purple conidiomata of *L. rubropurpurea* are unique in this genus and distinguish it from all other species (Burgess *et al.* 2006).

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griff. & Maubl., *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 25: 57. 1909. MycoBank MB188476. Fig. 46.

Basionym: *Botryodiplodia theobromae* Pat., *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 8: 136. 1892.

≡ *Diplodia theobromae* (Pat.) W. Nowell, *Diseases of Crop Plants in the Lesser Antiles*: 158. 1923.

= *Sphaeria glandicola* Schwein., *Trans. Am. phil. Soc.*, Ser. 2 4(2): 214. 1832.
 ≡ *Physalospora glandicola* (Schwein.) N.E. Stevens, *Mycologia* 25: 504. 1933.

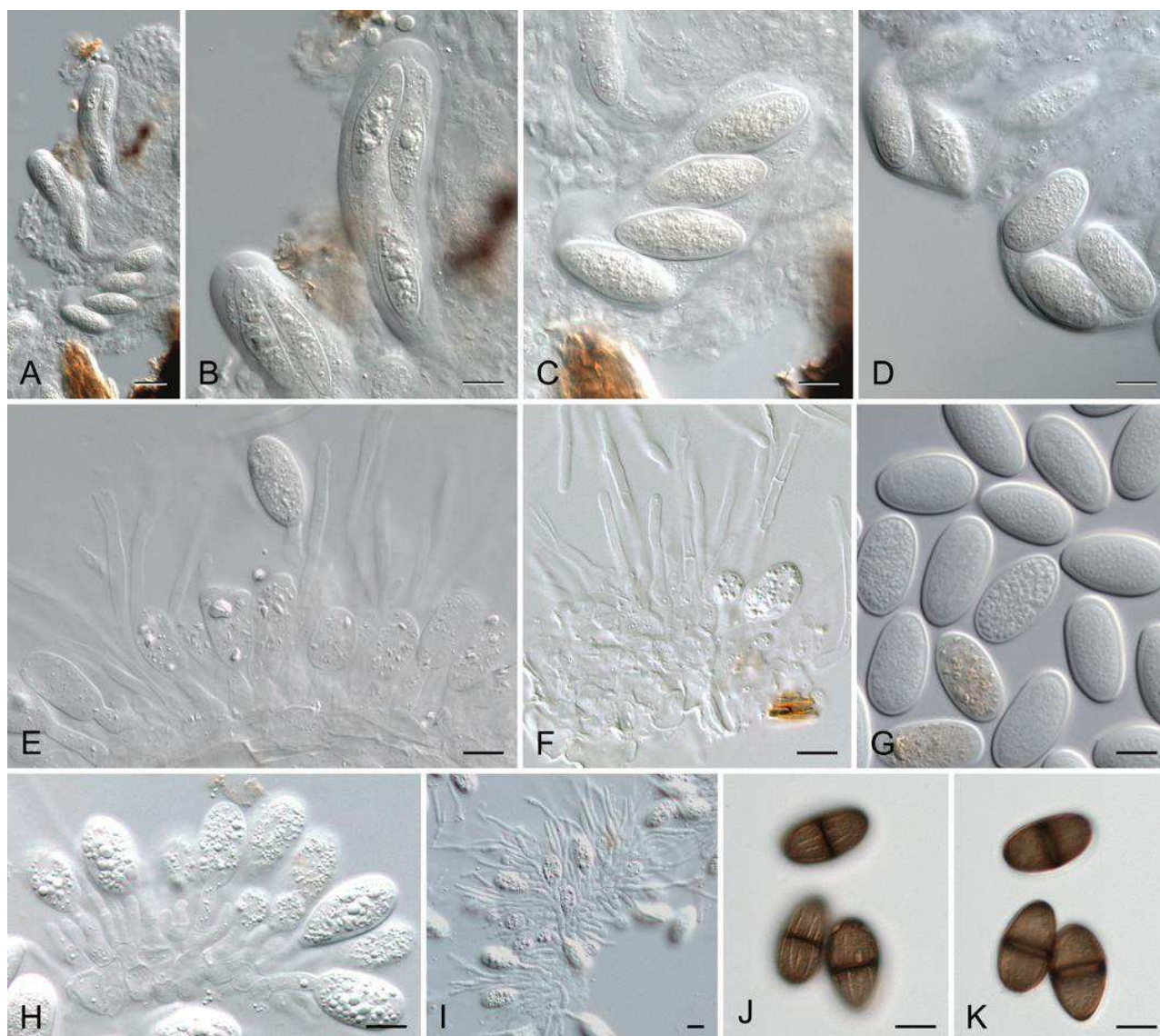


Fig. 46. *Lasiodiplodia theobromae* (A–D from holotype of *Sphaeria rhodina*). A, B. Asci. C, D. Ascospores. E, I. Conidiogenous layer with conidiogenous cells and paraphyses. F. Paraphyses. G. Immature hyaline conidia. H. Developing conidia. J, K. Mature, dark-walled, one-septate, striate conidia in two different focal planes. Scale bars = 10 µm.

- = *Physalospora rhodina* Berk. & M.A. Curtis, Grevillea 17: 92. 1889.
 ≡ *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, Gen. Fungi Sporul. Cult. (Lehr): 143. 1970.
- = *Diplodia gossypina* Cooke, Grevillea 7: 95. 1879.
- = *Macrophoma vestita* Prill. & Delacr., Bull. Soc. Mycol. Fr. 10: 165. 1894.
- = *Diplodia cacaoicola* Henn., Bot. Jb. 22: 80. 1895.
- = *Lasiodiplodia tuberculosa* Ellis & Everh., Bot. Gaz. 21: 92. 1896.
 ≡ *Diplodia tuberculosa* (Ellis & Everh.) Taubenh., Am. J. Bot. 2: 328. 1915.
 ≡ *Botryodiplodia tuberculosa* (Ellis & Everh.) Petr., Ann. Mycol. 21: 332. 1923.
- = *Botryodiplodia gossypii* Ellis & Barth., J. Mycol. 8: 175–176. 1902.
- = *Botryodiplodia elasticae* Petch., Ann. R. Bot. Gdns Peradeniya 3: 7. 1906.
- = *Diplodia arachidis* Petch., Ann. R. Bot. Gdns Peradeniya 3: 6. 1906.
- = *Chaetodiplodia grisea* Petch., Ann. R. Bot. Gdns Peradeniya 3: 6. 1906.
- = *Lasiodiplodia nigra* Appel & Laubert, Arbeiten Kaiserl. Biol. Anst. Ld.-u. Forstw. 5: 147. 1907.
- = *Diplodia rapax* Massee, Bull. Misc. Inf., Kew: 3. 1910.
- = *Diplodia natalensis* Pole-Evans Transvaal Dept. of Agricult. Sci. Bull. 4: 15. 1911 (1910).
- = *Diplodia manihoti* Sacc. (as “*maniothi*”), Ann. Mycol. 12: 310. 1914.
 ≡ *Botryodiplodia manihoti* (Sacc.) Petr. (as “*maniothi*”), Ann. Mycol. 22: 83. 1924.
- = *Botryodiplodia manihotis* Syd. & P. Syd., Ann. Mycol. 14: 202. 1916.
- = *Diplodia corchori* Syd. & P. Syd., Ann. Mycol. 14: 196. 1916.

- = *Diplodia musae* Died., Ann. Mycol. 14: 200. 1916.
- = *Lasiodiplodia triflorae* B.B. Higgins, Bull. Georgia Exp. Stn 118: 16. 1916.
- = *Diplodia ananassae* Sacc., Atti Acad. Sci. Ven.-Tren.-Istr. 10: 75. 1917.
 ≡ *Botryodiplodia ananassae* (Sacc.) Petr., Ann. Mycol. 27: 365. 1929.
- = *Physalospora gossypina* N.E. Stevens, Mycologia 17: 198. 1925.
- = *Botryodiplodia manihotica* Petr., In: Petrak & Syd., Feddes Repert., Beih. 42: 143. 1926.

Ascomata dark brown to black, aggregated, thick-walled, wall composed of dark brown, thick-walled *textura angularis*, becoming thinner and hyaline towards the inner layers, 250–400 µm diam. Asci bitunicate, clavate, stipitate, 8-spored, 90–120 µm long. Ascospores irregularly biseriolate, hyaline, aseptate (24–)30–35(–42) × (7–)11–14(–17) µm. Conidiomata stromatic, simple or aggregated, immersed in the host becoming erumpent when mature, dark brown, unilocular, thick- or thin-walled, wall formed of dark brown thick-walled *textura angularis*, frequently setose, up to 5 mm wide, ostiole central, single, papillate. Paraphyses hyaline, cylindrical, septate, occasionally branched, ends rounded, up to 55 µm long, 3–4 µm wide. Conidiophores hyaline, simple, sometimes septate, rarely branched, cylindrical, arising from the inner layers of

cells lining the locules. *Conidiogenous cells* hyaline, thin-walled, smooth, cylindrical to sub-obpyriform, holoblastic, discrete, determinate or indeterminate and proliferating percurrently with one or two distinct annellations, or proliferating at the same level, giving rise to periclinal thickenings. *Conidia* subovoid to ellipsoid-ovoid, apex broadly rounded, tapering to truncate base, widest in middle to upper third, thick-walled, contents granular, initially hyaline and aseptate, remaining hyaline for a long time, becoming dark brown and 1-septate only a long time after discharge from the conidiomata, with melanin deposits on the inner surface of the wall arranged longitudinally giving a striate appearance to the conidia, (19–)21.5–31.5(–32.5) × (12–)13–17 (–18.5) µm, 95 % confidence limits = 26.2–27 × 14–14.4 µm (av. ± S.D. = 26.2 ± 2.6 × 14.2 ± 1.2 µm, L/W ratio = 1.9).

Type: **Ecuador**, on *Theobroma cacao*, Lagerheim, holotype not found, and presumably lost. **Papua New Guinea**, Madang, Jais Aben, from unidentified fruit along coral reef coast, No. 1995, A. Aptroot, CBS H-21411, **neotype designated here**; MBT176098, culture ex-neotype CBS 164.96.

Cultures: CBS 164.96 (ex-neotype), CBS 111530.

Hosts: Punithalingam (1976) refers to a wide host range. Considering that the original concept of *L. theobromae* now refers to a complex of species (Alves et al. 2008), many of the older records of this fungus are unreliable.

Known distribution: Widely distributed in tropical and subtropical regions (Punithalingam 1976).

Notes: *Botryodiplodia theobromae* was originally described from *Theobroma cacao* in Ecuador. In spite of searching through literature and many herbaria, we have been unable to locate the holotype specimen. In recent years numerous new species have been described, but in spite of this, the generic application of the name, *L. theobromae*, has not been resolved. To address this issue, we thus designate CBS 164.96 as ex-neotype culture, and have deposited a dried specimen as neotype. Although this isolate, from an unidentified fruit on a coral reef coast in Papua New Guinea, is from neither the type locality (Ecuador) nor the type substrate (cocoa plant), it has long been regarded as a reference strain for *L. theobromae*. For this reason we consider that it best serves to stabilise this species by continuing to use this isolate as a reference strain and to elevate its status to ex-neotype.

The connection between *L. theobromae* and its sexual morph has not been proven conclusively. Stevens (1925) made single ascospore cultures from a fungus that he referred to as *Physalospora gossypina* on cotton stems in Florida, and from *Hicoria*, *Ilex*, *Liquidambar*, *Quercus* and *Vitis*. In all cases the conidia formed in these cultures were morphologically identical to those of *L. theobromae*. Stevens (1926) then determined that the fungus he called *P. gossypina* was in fact *Physalospora rhodina* Cooke, which was later transferred by von Arx (1970) to *Botryosphaeria* as *B. rhodina* (Cooke) Arx. However, there have been no subsequent reports to confirm this connection, leaving some doubts about its authenticity. Thus the connection between the sexual morph and asexual morph has not been established beyond all doubt and the value of the above description of the sexual morph is questionable. Phylogenetically this species is close to *L. mahajangana*, but it is easily separated by its larger conidia (av. = 26.2 × 14.2 µm) compared with *L. mahajangana* (av. = 17.5

× 11.5 µm). In terms of morphology *L. theobromae* is similar to *L. rubropurpurea*, but it differs from *L. rubropurpurea* by the absence of red-purple conidiomata. Moreover, conidial length of this species (av. length = 26.2 µm) is slightly shorter than in *L. rubropurpurea* (av. length = 28.2 µm).

Lasiodiplodia venezuelensis T.I. Burgess, Barber & Mohali, Mycologia 98: 432. 2006. MycoBank MB500237. See Burgess et al. (2006) for illustrations.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, superficial, smooth, cylindrical, mostly solitary, 0.5–1 mm diam, often oozing immature conidia. *Paraphyses* cylindrical, septate, hyaline (12–)16–41(–45) × (1.5–)2–5 µm (av. of 50 paraphyses = 28.3 × 3.5 µm). *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, subcylindrical to cylindrical to ampulliform, (5–)7–14(–15) × 3–4.5(–5), proliferating percurrently. *Conidia* initially hyaline, unicellular, ellipsoid to obovoid, thick-walled (1.5–)2.5(–3) µm, av. of 50 conidia = 1.96 µm) with granular contents, rounded at apex, occasionally truncate at base, becoming pigmented with one septum when mature or before germination, developing longitudinal striations when mature, 26–33 × 12–15 µm (av. of 75 conidia = 28.4 × 13.5 µm, L/W ratio = 2.1).

Culture characteristics: Colonies moderately dense, with appressed mycelial mat, initially white to buff turning pale olivaceous-grey within 7 d and becoming darker with age. After 7 d submerged mycelia olivaceous-grey, becoming black with age. Optimum temperature for growth 25 °C, reaching 75 mm on PDA after 3 d at 25 °C in the dark.

Type: **Venezuela**, Estado Portuguesa, Acarigua, from wood of living *Acacia mangium*, Oct. 2003, S. Mohali, **holotype** MURU 413.

Cultures: WAC12539 = CMW 13511 = CBS 118739 (ex-type), WAC12540 = CMW 13512.

Host: *Acacia mangium* (Burgess et al. 2006).

Known distribution: Venezuela (Burgess et al. 2006).

Notes: Phylogenetically, this species is closely related to *L. crassispora* and *L. rubropurpurea*, but can be distinguished from *L. rubropurpurea* by the absence of red-purple conidiomata. Furthermore, conidia of *L. venezuelensis* are narrower (av. = 28.4 × 13.5 µm) than those of *L. crassispora* (av. = 28.8 × 16 µm). In terms of morphology this species is similar to *L. viticola*, but conidia of *L. venezuelensis* (av. = 28.4 × 13.5 µm) are considerably larger than those of *L. viticola* (av. = 19.5 × 9.5 µm).

Lasiodiplodia viticola Úrbez-Torres, Peduto & Gubler, Fungal Divers. 52: 183. 2011. MycoBank MB519966. See Úrbez-Torres et al. (2010) for illustrations.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, solitary, formed on PDA within 3–4 wk, black, covered with moderately dense mycelium, up to 900 µm wide, globose to ovoid, thick-walled, unilocular, with a central ostiole, often oozing conidia. *Paraphyses* hyaline, cylindrical, aseptate, not branched, round at apex, up to

60 µm long, 2–3 µm wide. *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, smooth, cylindrical. *Conidia* produced in culture initially hyaline, unicellular, ellipsoidal, base rounded or truncate, thick-walled (1–2 µm), granular content, becoming dark brown, 1-septate, with longitudinal striations while still inside the conidiomata, (16.5–)18–20.5(–23) × (8–)9–10.1(–10.5) µm (av. of 60 conidia = 19.5 × 9.5 µm, L/W ratio = 2.05). *Colonies* on PDA with dense aerial mycelium, mycelium initially white becoming pale olive-buff within 7 d and turning iron grey to greenish black within 28 d, reverse dark slate blue after 28 d, reaching 90 mm on PDA after 48 h in the dark at 25 °C. Cardinal temperatures for growth: min 10 °C, max 35 °C, opt 25–30 °C.

Type: USA, Arkansas, Altus, on interspecific hybrid grape Vignoles cv. Ravat 51R, D. Cartwright & W. D. Gubler, **holotype** UCD2553AR.

Cultures: UCD2553AR = CBS 128313 (ex-type), UCD2604MO = CBS 128314.

Hosts: *Vitis* hybrids (Úrbez-Torres *et al.* 2010).

Known distribution: USA (Arkansas and Missouri) (Úrbez-Torres *et al.* 2010).

Note: Phylogenetically this species is closely related to *L. mahajangana*, *L. theobromae* and *L. iraniensis*, but can be easily distinguished based on conidial and paraphyses dimensions (see notes for *L. iraniensis*).

Macrophomina Petr. Ann. Mycol. 21: 314. 1923. MycoBank MB8814.

Type species: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., Annali Sper. agr. N.S. 1: 457. 1947.

Mycelium superficial or immersed, brown to hyaline, branched, septate, often dendroid in culture. *Ascomata* not reported. *Conidiomata* pycnidial, stromatic, separate, globose, dark brown, immersed, unilocular, thick-walled, wall consisting of an outer layer of dark brown thick-walled *textura angularis*, becoming hyaline towards the inside. *Ostiole* central, circular, papillate. *Conidiophores* absent. *Conidiogenous cells* enteroblastic, phialidic, determinate, discrete, lageniform to doliiform, hyaline, smooth, with wide aperture and minute collarette, formed from the inner cells of the pycnidial wall. *Conidia* hyaline, aseptate, obtuse at each end, straight, cylindrical to fusiform, thin-walled, smooth, guttulate. *Sclerotia* black, smooth, hard, formed of dark brown, thick-walled cells.

Note: Of the five species listed in MycoBank, only one (*M. phaseolina*) is known in culture.

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., Annali Sper. agr. N.S. 1: 457. 1947. MycoBank MB300023. See Crous *et al.* (2006) for illustrations.

Basionym: *Macrophoma phaseolina* Tassi, Bull. Lab. Ort. bot. Siena 4: 9. 1901.

≡ *Tiarosporella phaseolina* (Tassi) Aa, In: von Arx, Gen. Fungi Sporul. Cult., Edn 3 (Vaduz): 208. 1981.

Additional synonyms listed by Holliday & Punithalingam (1988).

Sclerotia occurring in host tissue or in soil, black, smooth, hard, 100–1000 µm diam. *Ascomata* not reported. *Conidiomata* pycnidial, stromatic, dark brown to black, solitary or gregarious, up to 200 µm diam, opening by a central ostiole, wall multilayered, cells dark brown, thick-walled. *Conidiophores* reduced to conidiogenous cells that are arranged along the inner lining of the conidioma, hyaline, short obpyriform to subcylindrical, proliferating several times percurrently near the apex, 6–12 × 4–6 µm, young conidiogenous cells having a mucous layer that extends over the apex of the developing conidium. *Conidia* ellipsoid to obovoid, (16–)20–24(–32) × (6–)7–9(–11) µm; immature conidia hyaline, enclosed in a mucous sheath that upon dehiscence encloses the top half of the conidium, becoming two lateral tentaculiform, apical mucoid appendages (type C, Nag Raj 1993); mature conidia becoming medium to dark brown, with a granular outer layer that in some cases appears pitted, without any mucoid appendages; conidium hilum frequently with a marginal frill.

Cultures: Niger, *Vigna minima*, M. Ndiaye, CPC 11052, 11070. Senegal, soil, M. Ndiaye, CPC 11079, 11085, 11106, 11108. Uganda, *Eucalyptus* sp., Jan. 1925, CBS 162.25; Unknown, *Zea mays*, Jun. 1933, S.F. Ashby, CBS 227.33.

Hosts: Plurivorous.

Known distribution: Cosmopolitan.

Notes: Although *Macrophomina phaseolina* can have apical mucoid appendages as found in *Tiarosporella* (Sutton & Marasas 1976), it is distinguished by having percurrently proliferating conidiogenous cells, which are not seen in any species of *Tiarosporella sensu* Nag Raj (1993), nor in those investigated by Crous *et al.* (2006), and conidia that become dark brown at maturity, and the presence of microsclerotia. Based on these differences (and in the absence of authentic cultures of *T. paludosa*), Crous *et al.* (2006) chose to retain the genus *Macrophomina* and the name *M. phaseolina*.

Neodeightonia Booth, in Punithalingam, Mycol. Pap. 19: 17. 1970 [1969]. MycoBank MB3450.

Type species: *Neodeightonia subglobosa* Booth, in Punithalingam, Mycol. Pap. 119: 19. 1970 [1969].

Ascstromata immersed, dark brown to black, with a single aparaphysate locule, wall composed of pseudoparenchymatic cells many layers thick, asci developing amongst partially disintegrating sterile thin-walled tissue in locule. Neck of ascstromata narrow, opening by an apical ostiole, formed by the disintegration of the central thin-walled cells. *Pseudoparaphyses* hyphae-like, septate, constricted at the septa. *Asci* parallel, more or less separated from one another by stromatic tissue, clavate to cylindrical-clavate, 8-spored, bitunicate with a thick endotunica. *Ascospores* biseriolate, initially hyaline, brown when mature, oval to broadly ellipsoidal with a single transverse septum, surrounded or not by a mucilagenous sheath. *Conidiomata* brown to black, solitary or aggregated, sometimes intermixed with ascomata, globose, uni- to multilocular, stromatic, wall composed of dark-brown thick-walled *textura angularis*. *Paraphyses* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, aseptate, cylindrical to sub-cylindrical. *Conidia* spherical to globose, initially hyaline, pale to dark brown when mature, thick-walled, smooth to finely rough-walled with fine striations.

Notes: *Neodeightonia* was introduced by Booth (Punithalingam 1969). Von Arx & Müller (1975) transferred *N. subglobosa* to *Botryosphaeria*, and because this is the type species of the genus, they reduced *Neodeightonia* to synonymy under *Botryosphaeria*. However, morphologically (based on the dark, 1-septate ascospores) and phylogenetically (Phillips *et al.* 2008), this genus is distinguishable from *Botryosphaeria*, and the genus was reinstated by Phillips *et al.* (2008). Punithalingam (1969) referred to germ slits in the conidia. Crous *et al.* (2006) suggested that these were in fact striations on the conidial wall, and that more than one could occur per conidium, a feature confirmed by Phillips *et al.* (2008). The striate walls suggest an affinity to *Lasiodiplodia*. Nevertheless, *Neodeightonia* can be distinguished from *Lasiodiplodia* by the absence of conidiomatal paraphyses. Thus, conidial striations distinguish *Neodeightonia* from *Diplodia*, and the absence of conidiomatal paraphyses distinguishes it from *Lasiodiplodia*.

DNA phylogeny

The three species fall in three clades with *N. palmicola* distantly related to the other two known species (Fig. 47).

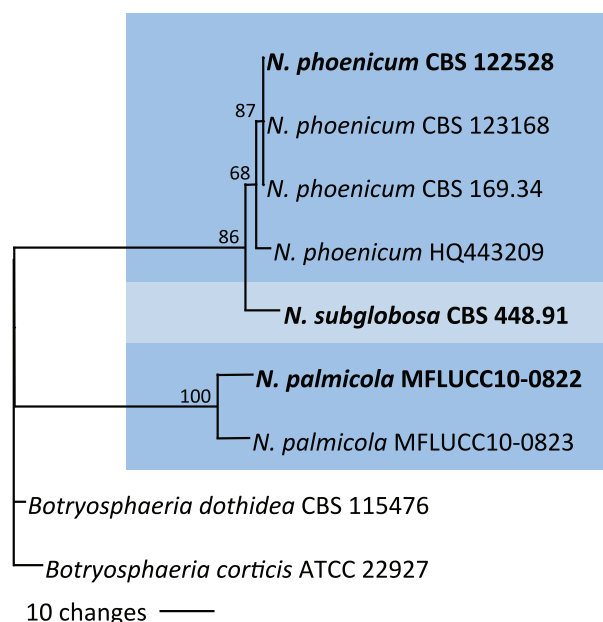


Fig. 47. The single most parsimonious tree obtained from ITS sequences of *Neodeightonia* species. Bootstrap values from 1000 replicates are given at the nodes.

Key to *Neodeightonia* spp.

The three species known in culture can be separated on conidial length:

1. Conidia less than 15 µm long, 9–12 µm long *N. subglobosa*
1. Conidia longer than 15 µm 2
2. Conidia 15.5–21.5 µm long *N. phoenicum*
2. Conidia never shorter than 17 µm, 17.5–24.5 µm long *N. palmicola*

Species descriptions

Neodeightonia palmicola J.K. Liu, Phookamsak & K.D. Hyde, Sydowia 62: 268. 2010. MycoBank MB518804. Fig. 48.

Ascomata uniloculate, immersed to erumpent in host tissue, globose to subglobose, brown to dark brown, rounded at the base, 180–230 µm high (excluding the neck), 270–420 µm diam. *Ostiole* circular, central, papillate. *Peridium* 26–55 µm wide, comprising several layers of brown-walled cells, the outer stratum of 1–3 cells comprising thick, dark brown walls, the inner layer 3–5 cells, *textura angularis* comprising pale brown to hyaline, thin-walled cells. *Pseudoparaphyses* thin-walled, hyaline, frequently septate, often constricted at the septa, up to 3–5 µm diam. *Asci* 8-spored, bitunicate, fissitunicate, with thick endotunica, clavate to cylindrical-clavate, stipitate, apically rounded, with a well-developed ocular apical chamber, arising from the base of ascoma, (80–)110–210(–225) × 17–22.5(–24) µm (av. = 154.2 × 20.5 µm). *Ascospores* obliquely uniseriate or irregularly biseriata, ellipsoidal-fusiform or fusiform, widest in the middle, both ends obtuse, 1-celled, aseptate, hyaline, smooth, thin-walled, with bipolar germ pores, surrounded by a wing-like hyaline sheath, 23–31.5 × 8.5–12.5 µm (av. = 27 × 10 µm). *Conidioma* (formed on WA on sterilised pine needles within 21–28 d) uniloculate, semi-immersed, solitary, globose, covered by

mycelium, up to 240 µm wide, wall 4–8 cell layers thick, composed of dark brown thick-walled *textura angularis*, becoming thin-walled and hyaline toward the inner region. *Conidiogenous cells* holoblastic, cylindrical to subcylindrical, hyaline, 9–20 × 3–6 µm. *Conidia* initially hyaline, unicellular, ellipsoid to obovoid, thick-walled with granular content, rounded at apex, occasionally truncate at base, aging conidia becoming cinnamon to sepia, forming a single septum, 17.5–24.5 × 9.5–12.5 µm (av. of 50 conidia = 21.5 × 11.0 µm).

Type: Thailand, Chiang Rai, Muang District, Khun Korn Waterfall, on dead leaves of *Arenga westerhoutii*, 18 Dec. 2009, Jian-Kui Liu, holotype MFLU10 0407.

Culture: MFLUCC10 0822 = CBS 136074 (ex-type).

Host: *Arenga westerhoutii* (Liu *et al.* 2010).

Known distribution: Thailand (Liu *et al.* 2010).

Notes: This species is unusual in having ascospores surrounded by a mucilaginous sheath and pycnidial paraphyses, features not seen in other species of *Neodeightonia*. Furthermore, there are no striations on the conidia and it is also phylogenetically somewhat divergent from other *Neodeightonia* species.

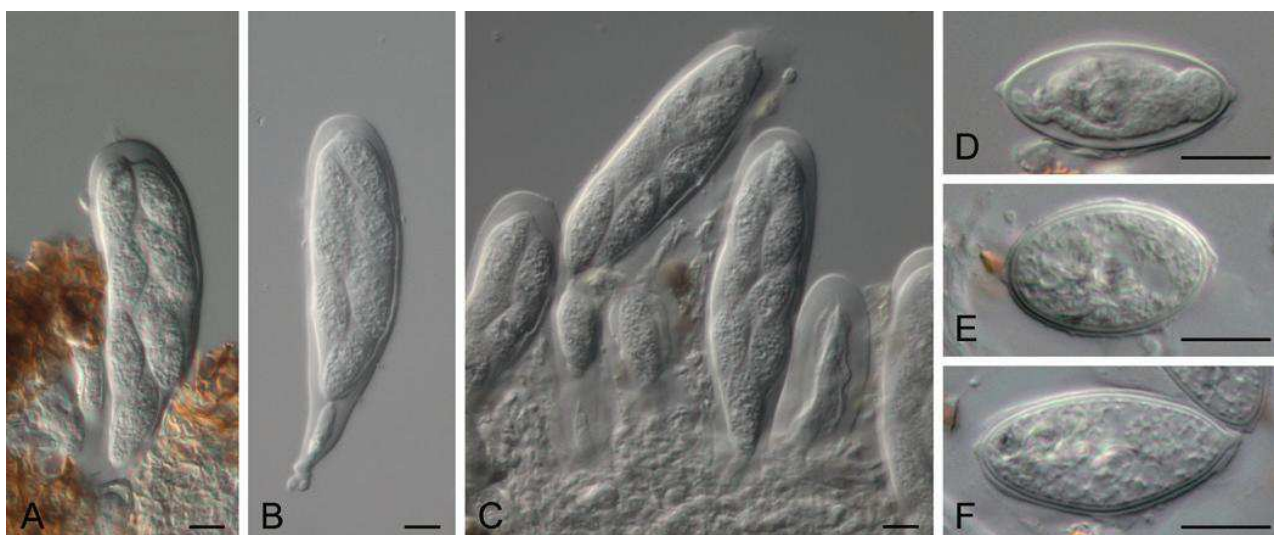


Fig. 48. *Neodeightonia palmicola*. A–C. Asci. D–F Ascospores with apiculi at either end. Scale bars = 10 µm.

Neodeightonia phoenicum A.J.L. Phillips & Crous, *Persoonia* 21: 43. 2008. MycoBank MB511708. Fig. 49.

- = *Macrophoma phoenicum* Sacc., *Annular. R. Ist. Bot. Roma* 4: 195. 1890.
- ≡ *Diplodia phoenicum* (Sacc.) H.S. Fawc. & Klotz, *Bull. Calif. Agric. Exp. Sta.* 52: 8. 1932.
- ≡ *Strionemadiplodia phoenicum* (Sacc.) Zambett., *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* 70: 235. 1955 (1954).

Ascomata not reported. *Conidiomata* formed on pine needles in culture pycnidial, stromatic, multiloculate, dark brown to black, immersed in the host becoming erumpent when mature. *Paraphyses* absent. *Conidiogenous cells* hyaline, smooth, cylindrical, swollen at the base, holoblastic, proliferating percurrently to form one or two annellations, or proliferating at the same level giving rise to periclinal thickenings. *Conidia* ovoid to ellipsoid, apex and base broadly rounded, widest in the middle to upper third, thick-walled, initially hyaline and aseptate, becoming dark brown and 1-septate some time after discharge from the pycnidia, with melanin deposits on the inner surface of the wall arranged longitudinally giving a striate appearance to the conidia, (14.5–)15.5–21.5(–24) × (9–)10–12(–14) µm, 95 % confidence limits = 18.6–19.5 × 11.2–11.8 µm (av. ± S.D. = 19.1 ± 1.7 × 11.5 ± 1.1 µm), L/W ratio = 1.7.

Type: Spain, Catalonia, Tarragona, Salou, on *Phoenix* sp., F. Garcia, **holotype** CBS H-20108.

Cultures: CBS 122528 (ex-type), CBS 123168, CBS 169.34.

Hosts: *Phoenix* spp. (Phillips *et al.* 2008).

Known distribution: Spain, USA (California) (Phillips *et al.* 2008).

Neodeightonia subglobosa C. Booth, *Mycol. Pap.* 119: 19. 1970 (1969). MycoBank MB318601. Fig. 50.

- ≡ *Botryosphaeria subglobosa* (C. Booth) Arx & E. Müll., *Stud. Mycol.* 9: 15. 1975.
- = *Sphaeropsis subglobosa* Cooke, *Grevillea* 7: 95. 1879.
- ≡ *Macrodiplodia subglobosa* (Cooke) Kuntze, *Revis. gen. pl.* 3: 492. 1898.
- ≡ *Coniothyrium subglobosum* (Cooke) Tassi, *Bulletin Labor. Orto Bot. de R. Univ. Siena* 5: 25. 1902.

Ascomata immersed, up to 300 µm wide, dark brown to black with a single locule, paraphysate, locule filled with disintegrating sterile thin-walled tissue, amongst which the asci develop, neck narrow, cone-shaped, opening by an apical ostiole. Asci bitunicate, clavate, with well-developed apical chamber, 110–140 × 16–20 µm, 8-spored. *Ascospores* hyaline, aseptate, becoming brown and 1-septate, ovoid to broadly ellipsoidal, smooth or with a finely roughened surface, 20–26 × 7–10 µm. *Conidiomata* brown to black, solitary or aggregated, sometimes intermixed with ascomata, globose, uni- to multilocular, stromatic, up to 200 µm broad. *Paraphyses* absent. *Conidiogenous cells* holoblastic, simple, hyaline. *Conidia* spherical to globose, pale to dark brown when mature, smooth to finely rough-walled, 9–12 × 6–9 µm.

Type: Sierra Leone, Njala (Kori), on dead culms of *Bambusa arundinacea*, 17 Aug. 1954, F.C. Deighton, **holotype** IMI 57769(f).

Culture: CBS 448.91 (ex-type).

Host: *Bambusa arundinacea* (Punithalingam 1969).

Known distribution: Sierra Leone (Punithalingam 1969).

Notes: According to Phillips *et al.* (2008) the type specimen of *Neodeightonia subglobosa* contains only immature asci with hyaline ascospores. However, Punithalingam (1969) clearly described and illustrated the ascospores as brown and 1-septate. According to Punithalingam (1969) this species is homothallic and forms asci in culture.

Neofusicoccum Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Stud. Mycol.* 55: 247. 2006. MycoBank MB500870.

Type species: *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Stud. Mycol.* 55: 248. 2006.
Synasexual morph: *Dichomera*-like.

Notes: *Neofusicoccum* was introduced by Crous *et al.* (2006) for species that are morphologically similar to, but phylogenetically distinct from *Botryosphaeria* and thus could no longer be accommodated in that genus. Morphologically *Neofusicoccum*

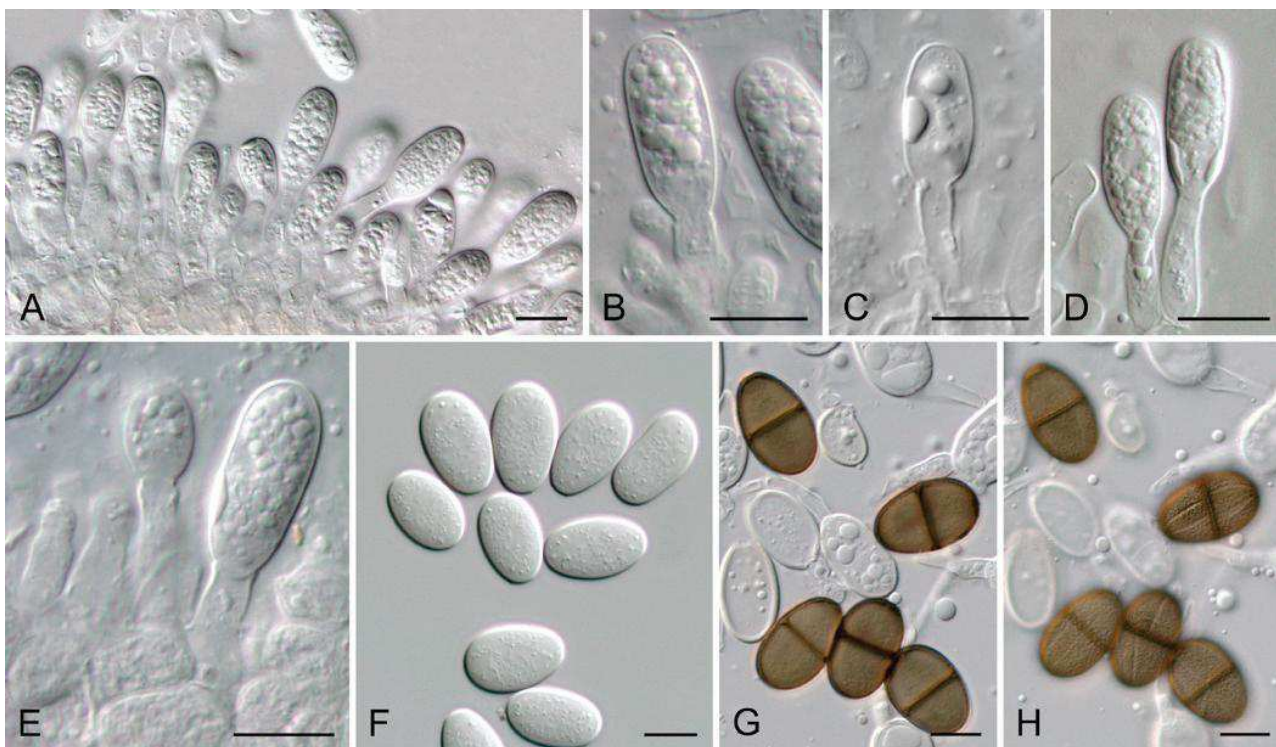


Fig. 49. *Neodeightonia phoenicum*. A. Conidiogenous layer. B–E. Conidiogenous cells. F. Hyaline, aseptate conidia. G, H. Brown, 1-septate conidia with longitudinal striations. Scale bars = 10 μ m.

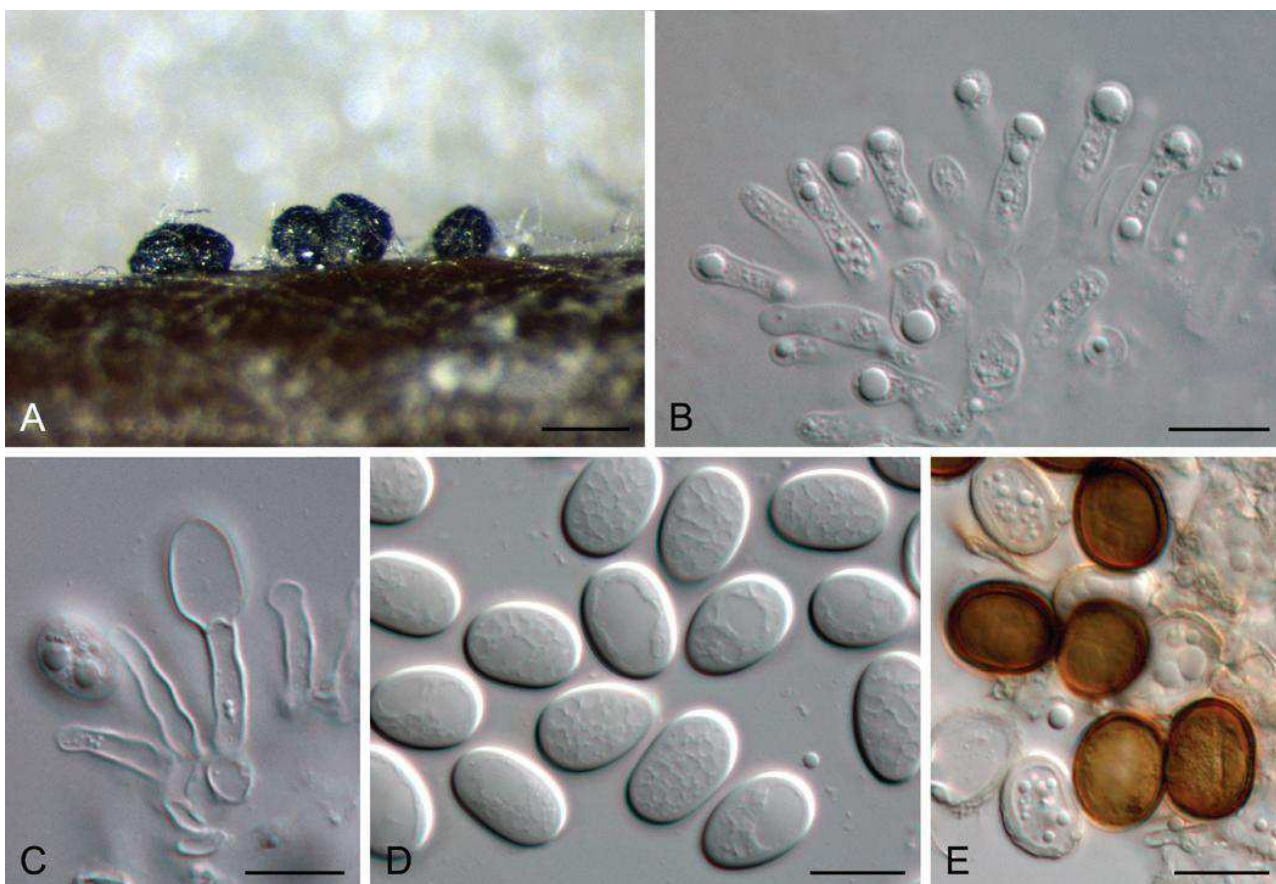


Fig. 50. *Neodeightonia subglobosa*. A. Globose conidiomata. B, C. Conidiogenous cells. D. Hyaline conidia. E. Mature, brown conidia with faint striations. Scale bars: A = 250 μ m, B–E = 10 μ m.

resembles *Botryosphaeria* and it can be difficult to separate the two genera. The presence of a *Dichomera* synasexual

morph in *Neofusicoccum* has been used to differentiate it from *Botryosphaeria*. However, not all *Neofusicoccum* species, or even

all isolates of any given species form such a synasexual morph, and some isolates of *B. dothidea* have been reported to form dichomera-like conidia (Phillips *et al.* 2005, Barber *et al.* 2005). Paraphyses have not been reported in conidiomata of any *Neofusicoccum* species, but have been seen in most of the currently accepted *Botryosphaeria* species. However, the similarity of paraphyses to developing conidiogenous cells makes this feature difficult to apply as a general rule to separate the two genera. Conidial L/W ratios of the fusicoccum-like state are normally less than 4 and the conidia are more ellipsoidal than in the definitely fusiform ones of *Fusicoccum s. str.*

Currently 22 species are recognised in *Neofusicoccum* and they have been separated on the basis of conidial dimensions and pigmentation, pigment production in culture media and ITS sequence data, although taxonomic significance of some of these characters have recently been questioned (Abdollahzadeh *et al.* 2013). Species in some of the species complexes are morphologically indistinguishable and are defined almost exclusively on sequence of ITS often together with loci of other genes. In some cases, multi-gene sequence data are essential to unambiguously identify the species.

Species in *Neofusicoccum* appear to be evolving quite rapidly and this is reflected in the appearance of distinct groups of isolates in various geographic regions with fixed nucleotide differences in ITS and EF1- α and other regions of the genome. Some have

already been described as new species (Pavlic *et al.* 2009) while others are regarded as local variants (e.g. Lazzizzera *et al.* 2008, Spagnolo *et al.* 2010). Many of the species in *Neofusicoccum* are morphologically similar and can be very difficult to distinguish from one another. *Neofusicoccum* species are notoriously variable and the full range of variability within species has not been determined for most of the species. Nevertheless, an attempt has been made to differentiate all species in the key presented here, but it must be stressed that the outcome should be checked carefully against the description of that species. Host association has been used in this key for some species that have thus far not been found on any other host. However, it must be borne in mind that this apparent host specialisation may not be absolute. For example, *N. vitifusiforme* was originally considered to be restricted to *Vitis* (van Niekerk *et al.* 2004), but was later isolated from rotting olive drupes in Southern Italy (Lazzizzera *et al.* 2008) and shown to be pathogenic on that host. Some species may well be truly host specific, such as *N. arbuti* (Farr *et al.* 2005) and *N. protearum* (Denman *et al.* 2003), which have not yet been found on any other host since they were first described.

Some species can be determined relatively easily. For example, the conidia of *N. macroclavatum* and *N. pennatisporum* are far longer than any other species in the genus and these two species are easily differentiated on the shape and dimensions of their conidia.

Key to *Neofusicoccum* spp.

1. Average length of conidia 30 μm or more 2
1. Average length of conidia less than 30 μm 3
2. Conidia fusiform, up to 50 μm long *N. pennatisporum*
2. Conidia clavate-fusiform, length not exceeding 41 μm *N. macroclavatum*
3. Average length of conidia 25 μm or more 4
3. Average length of conidia less than 25 μm 7
4. Average conidial width less than 6 μm *N. andinum*
4. Average conidial width 7 μm or more 5
5. On *Eucalyptus* spp. *N. eucalypticola*
5. On hosts other than *Eucalyptus* 6
6. On *Grevillea* spp., conidial length not exceeding 32 μm *N. grevilleae*
6. On hosts other than *Grevillea*, conidial length up to 40 μm *N. protearum*
7. Average length of conidia 20 μm or more 8
7. Average length of conidia less than 20 μm 15
8. Conidial L/W ratio 4 or more 9
8. Conidial L/W ratio less than 4 11
9. Average conidial width 6 μm , L/W ratio 4 *N. mediterraneum*
9. Average conidial width less than 6, L/W ratio greater than 4 10
10. No yellow pigment, on *Syzygium cordatum* *N. cordaticola*
10. Yellow pigment on PDA, on hosts other than *Syzygium* *N. australe*
11. Average conidial width 7 μm or more 12
11. Average conidial width less than 7 μm 13
12. Conidial width less than 11 μm *N. nonquaesitum*¹
12. Conidial width up to 12 μm *N. eucalyptorum*¹

| | |
|---|---------------------------|
| 13. Broad host range, average conidial width less than 6 µm | <i>N. ribis</i> |
| 13. Narrow host range, average conidial width greater than 6 µm | 14 |
| 14. On <i>Syzygium cordatum</i> , from South Africa | <i>N. kwambonambiense</i> |
| 14. On hosts other than <i>Syzygium</i> , from outside Africa | <i>N. arbuti</i> |
| 15. Average conidial length less than 15 µm | <i>N. mangiferae</i> |
| 15. Average conidial length greater than 15 µm | 16 |
| 16. Conidial L/W ratio less than 3 | 17 |
| 16. Conidial L/W ratio greater than 3 | 18 |
| 17. Conidia fusoid to ovoid, L/W ratio 2.9 | <i>N. batangarum</i> |
| 17. Conidia ellipsoid to clavate, L/W ratio 2.4 | <i>N. viticlavatum</i> |
| 18. Average conidial length less than 18 µm | <i>N. parvum</i> |
| 18. Average conidial length greater than 18 µm | 19 |
| 19. Yellow pigment on PDA | <i>N. luteum</i> |
| 19. No yellow pigment | 20 |
| 20. Conidia L/W ratio 3.3 | <i>N. vitifusiforme</i> |
| 20. Conidia L/W ratio 3.5 | 21 |
| 21. Conidia fusiform to oval, average length greater than 19 µm | <i>N. umdonicola</i> |
| 21. Conidia fusiform to ellipsoid, average length less than 19 µm | <i>N. occulatum</i> |

¹Morphologically it is very difficult to separate these two species, but phylogenetically they are clearly distinct.

Notes: In this key we have used conidial morphology and dimensions, cultural characteristics, host association and geographic distribution to separate all the 22 described *Neofusicoccum* species. But, it is important to consider that there is overlap between species in some of those characters. Furthermore, some characters are not stable between populations or individuals of a given species. For example, not all isolates of *N. luteum* and *N. australe* produce a yellow pigment in culture media and recently we found this pigment production in some isolates of *N. parvum*. Thus, definitive identification of most of the species is dependent on the use sequence data for the ITS region alone, or more often in combination with EF1- α sequence data.

DNA phylogeny

Phylogenetic analyses were done using ITS alone and ITS combined with EF1- α . No EF1- α sequences are available for *N. protearum*, *N. corticosae* and *N. grevilleae*. Thus, the phylogenetic position of these species was deduced based on ITS phylogeny. Phylogenetic analysis using ITS sequence data revealed 21 *Neofusicoccum* species (Fig. 51). With the exception of *N. ribis* and *N. occulatum*, all of the species in the *N. ribis* / *N. parvum* species complex can be separated based on ITS alone (Fig. 51). However, the bootstrap support was quite low for most of them. In the ITS phylogeny, *D. eucalypti* and *N. corticosae* were grouped with *N. vitifusiforme* in a single clade but with only 63 % support. On the other hand, in the phylogenetic analysis based on ITS and EF1- α , *D. eucalypti* was grouped with *N. vitifusiforme* (Fig. 52), which suggests that *D. eucalypti* is a synasexual morph of *N. vitifusiforme*. Despite the absence of *N. corticosae* in the ITS/EF1- α phylogeny, in the ITS phylogenetic tree it is clear that *N. corticosae* is a synonym of *N. vitifusiforme*.

Species descriptions

Neofusicoccum andinum (Mohali, Slippers & M.J. Wingf.) Mohali, Slippers & M.J. Wingf., Stud. Mycol. 55: 247. 2006. MycoBank MB500871. See Mohali *et al.* (2006) for illustrations.

Basionym: *Fusicoccum andinum* Mohali, Slippers & M.J. Wingf., Mycol. Res. 110: 408. 2006.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, superficial, produced abundantly on the surface of MEA at 25 °C, oozing conidia after 30 d at 25 °C on MEA, solitary or botryose, globose, (331–)374–597(–740) × (302–)339–557(–671) µm (av. of 50 conidiomata = 486 × 448 µm); conidiomata wall, composed of brown *textura angularis*, 6–8 cell layers thick. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, smooth, cylindrical, producing a single apical conidium, proliferating enteroblastically, (8–)11–17(–23) × (1.5–)2–2.5(–3) µm. *Conidia* hyaline, granular, clavate to slightly navicular, apex obtuse and base truncate, 0–1 septa, (19–)23–31(–40) × (4–)5–6(–8) µm (av. of 50 conidia = 27 × 5.5 mm), L/W ratio = 4.84. *Dichomera* synasexual morph not reported.

Culture characteristics: Colonies on MEA at 25 °C in darkness for 15 d fluffy and flat becoming pale olivaceous-grey (surface) and olivaceous buff (reverse), producing columns of mycelium reaching the Petri dish lid after 30 d at 25 °C, reaching 80 mm diam on MEA after 4 d in the dark at 25 °C. Cardinal temperatures for growth: min 15 °C (reaching an average 24 mm diam), max < 35 °C, opt 20–30 °C.

Type: Venezuela, Mérida State, Merida, Mucuchies (3140 m), Cordillera of Los Andes, on branches of *Eucalyptus* sp., Feb. 2003, S. Mohali, **holotype** PREM 58238.

Notes: *Neofusicoccum eucalyptorum* is a sister species to *N. eucalypticola* and the two can be separated on the shapes and dimensions of conidia formed in culture. See notes for *N. eucalypticola*.

Neofusicoccum grevilleae Crous & R.G. Shivas, *Persoonia* 26: 117. 2011. MycoBank MB560162. See Crous *et al.* (2011) for illustrations.

Leaf spots medium brown, situated along leaf margins, surrounded by a dark red-brown border, spots extending to the midrib, up to 7 mm diam, and up to 2 cm long. *Conidiomata* amphigenous, stromatic, up to 200 µm diam (on sterilised pine needles). Wall consisting of 3–5 layers of brown *textura angularis*. *Conidiophores* lining the inner layer of conidioma, hyaline, smooth, 0–1-septate, 15–30 × 3–5 µm. *Conidiogenous cells* holoblastic, integrated, doliform to subcylindrical, phialidic, proliferating 2–3 times percurrently near apex, 15–25 × 3–4 µm. *Conidia* hyaline, smooth, thin-walled, with granular cytoplasm, fusoid-ellipsoidal, widest in middle or in upper third of conidium, apex subobtuse, base truncate, (20–)25–28(–32) × (6–)7–8(–10) µm (av. size of conidia = 25.7 × 7.5 µm), L/W = 3.4.

Culture characteristics: Colonies after 14 d at 25 °C in darkness flat, spreading, with abundant, grey aerial mycelium, covering the dish after 7 d, on PDA, OA and MEA iron-grey, sporulating poorly on water agar supplemented with sterile pine needles. *Spermatia* not reported. *Dichomera* synasexual morph not reported.

Type: **Australia**, Queensland, Brisbane, on leaves of *Grevillea aurea*, 14 Jul. 2009, P.W. Crous & R.G. Shivas, **holotype** CBS H-20578.

Cultures: CBS 129518 = CPC 16999 (ex-type).

Host: *Grevillea aurea* (Crous *et al.* 2011).

Known distribution: Australia, Western Australia (Crous & Shivas 2011).

Notes: Based on ITS sequence data, *N. grevilleae* is most closely related to the *N. ribis* / *N. parvum* complex, but conidia of *N. grevilleae* (25.7 × 7.5 µm) are larger than those of all seven species in that complex.

Neofusicoccum kwambonambiense Pavlic, Slippers & M.J. Wingf., *Mycologia* 101: 643. 2009. MycoBank MB512499. See Pavlic *et al.* (2009) for illustrations.

Ascomata not reported. *Neofusicoccum kwambonambiense* is morphologically similar to other related species in the *N. parvum* / *N. ribis* species complex. *Conidia* hyaline, unicellular, fusiform to ellipsoid, apices rounded 16–28 × 5–8 µm (av. 140 conidia 22.3 × 6.3 µm), L/W 3.6. It differs from other species in the *N. parvum* / *N. ribis* complex by uniquely fixed nucleotides in four nuclear loci: ITS (EU821900) position 163 (T) and 173 (G); β-tubulin (EU821840) position 175 (T), 235 (A) and 251 (A); locus BotF15 (EU821804) position 87, and 172; RNA polymerase II subunit (EU821930) positions 49 (G), 382 (A), 421 (A) and 526 (C). *Spermatia* not reported. *Dichomera* synasexual morph not reported.

Type: **South Africa**, Kwazulu-Natal Province, Kwambonambi, on symptomless branches and leaves, dying branches and pulp of ripe fruits of *Syzygium cordatum*, Mar 2002, D. Pavlic, a dry culture on pine needles, **holotype** PREM 60067.

Cultures: CMW 14023 = CBS 123639 (ex-type), CMW 14140 = CBS 123641.

Host: *Syzygium cordatum* (Pavlic *et al.* 2009).

Known distribution: South Africa (Pavlic *et al.* 2009).

Note: See notes for *N. cordaticola*.

Neofusicoccum luteum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Stud. Mycol.* 55: 248. 2006. MycoBank MB500876. Fig. 55.

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

= *Botryosphaeria lutea* A.J.L. Phillips, *Sydowia* 54: 70. 2002.

Ascomata initially immersed, later becoming erumpent through the host tissue, black, < 0.5 mm diam, uni- or multilocular, locules spherical to ovoid, 150–200 µm diam, ascomata and conidiomata often formed in the same stroma, opening through a nonperiphysate ostiole, with a short neck, wall consisting of 8–12 layers of dark brown to black, thick-walled cells, forming pseudoparenchymatic *textura angularis*, up to 60 µm thick, with 3–4 layers of thin-walled, hyaline cells lining the cavity. *Asci* bitunicate, cylindrical, to clavate, stipitate, 84–176 × 16–24 µm, 8-spored, associated with filamentous pseudoparaphyses. *Pseudoparaphyses* hyaline, septate, branched, 2–3.5 µm wide. *Ascospores* irregularly biserial in the ascus, hyaline, guttulate, smooth, aseptate, oval to broadly fusiform, widest in the middle or upper third of the ascospore, tapering to the obtuse base and apex 18–22.5(–24) × 7.5–12 µm. *Conidiomata* frequently formed on the same stromata as the ascomata, stromatic, separate or confluent, dark brown to black, uni- or multilocular immersed in the host, sub-peridermal, locules up to 150 µm diam, walls consisting of a dark brown *textura angularis*, becoming smaller, thinner-walled and hyaline towards the conidiogenous region. *Ostioles* papillate, circular. *Conidiophores* hyaline, smooth, thin-walled, rarely branched at the base, cylindrical, formed from the cells of the inner locule wall, 8–19 × 3–4 µm. *Conidiogenous cells* holoblastic, discrete, integrated, hyaline, smooth, cylindrical, producing the first conidium holoblastically and subsequent conidia enteroblastically, proliferating percurrently with 2–3 indistinct percurrent proliferations, or proliferating internally forming typical phialides (*sensu* Sutton, 1980) and periclinal thickening, (6–)8–16(–18) × (2.5–)3–4(–4.5) µm. *Conidia* hyaline, thin-walled, aseptate, smooth, ellipsoidal, widest in the middle or upper third of the conidium, apex subobtuse, base truncate (15–)16.5–22.5(–24) × 4.5–6(–7.5) µm, 95 % confidence limits of 242 conidia = 19.4–19.9 µm (av. ± S.D. of 242 conidia = 19.7 ± 1.8 × 5.6 ± 0.6 µm), L/W ratio = 3.6 ± 0.5 with 95 % confidence limits = 3.5, often with a minute basal frill. *Spermatia* hyaline, rod-shaped to reniform with either truncate or rounded ends 3–5 × 1 µm. *Dichomera* synasexual morph not reported.

Type: of sexual morph: **Portugal**, Estremadura, Oeiras, Quinta do Marquês, on cane of *Vitis vinifera* cv. Galego Dourado, Mar.

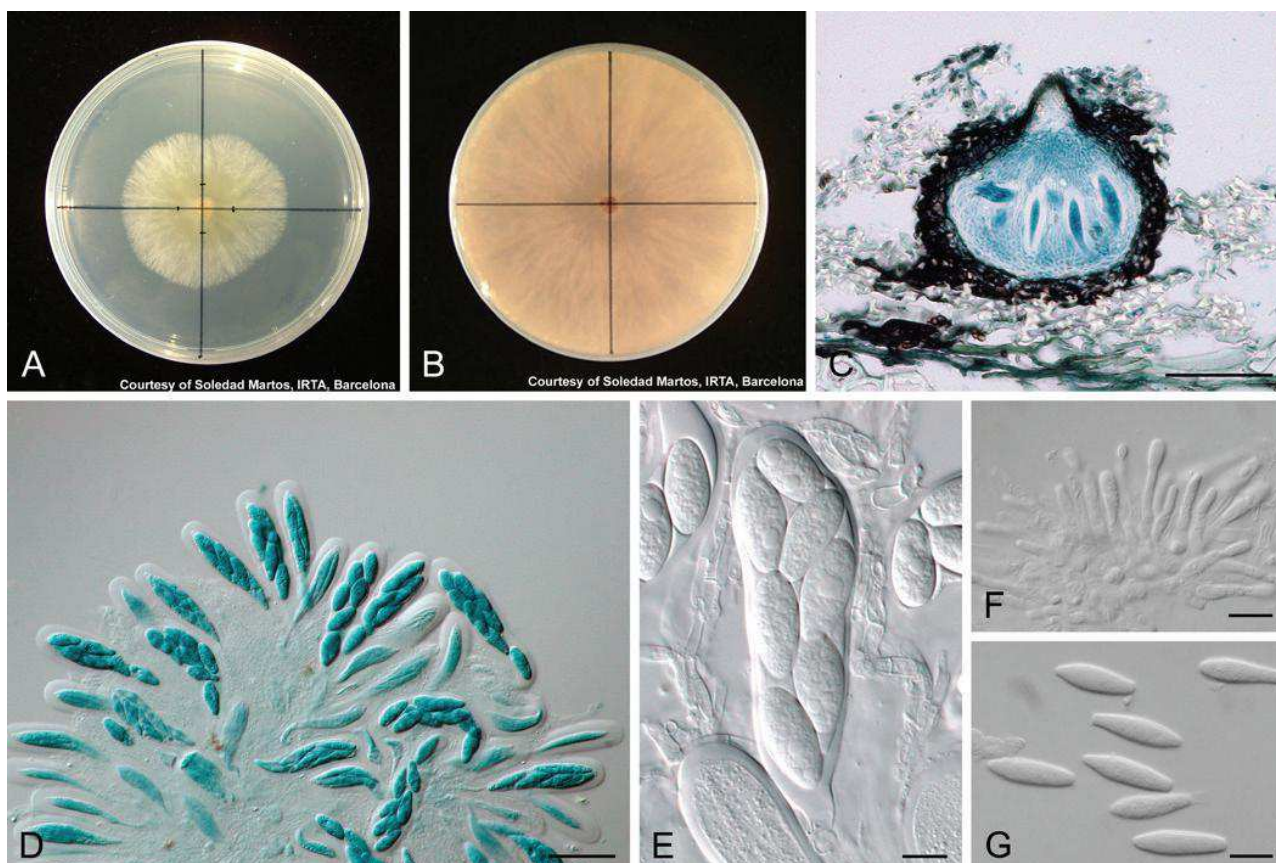


Fig. 55. *Neofusicoccum luteum*. A, B. Cultures of *N. luteum* on PDA after 2 days (A) and 4 days (B) of incubation at 25 °C. A pale yellow pigment is produced at first (A) that later becomes violaceous (B). C. Vertical section through an ascoma. D. Asci stained with cotton blue. E. Ascus with eight ascospores. F. Conidiogenous cells. G. Conidia. Scale bars: C = 100 µm, D = 50 µm, E–G = 10 µm.

1996, A.J.L. Phillips, **holotype** LISE 94070; of asexual morph: **New Zealand**, Bay of Plenty, Te Puke, No 1 Road, DSIR Research Orchard, from lesions on ripe fruit of *Actinidia deliciosa*, 6 Oct. 1982, S.R. Pennycook, **holotype** PDD 45400.

Cultures: PDDCC 8004 = ATCC 58193 (ex-type of asexual morph) / CBS 110299 (ex-type of sexual morph), CAP037.

Hosts: Plurivorous including *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa* (Gadgil et al. 2005, Pennycook & Samuels 1985), *Banksia* sp., *Buckinghamia* sp. (Denman et al. 2003), *Chamaecyparis lawsoniana*, *Cupressus sempervirens*, *C. lusitanica*, *Juniperus communis*, *Pinus pinea*, *Sequoia sempervirens*, *Thuja plicata* (Alves et al. 2013), *Chrysanthemoides monilifera* (Cunnington et al. 2007), *Crataegus mexicana* (Adesmoye et al. 2013), *Diospyros kaki* (Gadgil et al. 2005), *Eucalyptus* sp. (Denman et al. 2003), *Ficus microcarpa* (Mayorquin et al. 2012), *Fraxinus angustifolia* (Phillips et al. 2002), *Malus domestica* (Gadgil et al. 2005), *Olea europaea* (Sergeeva et al. 2009), *Persea americana* (McDonald & Eskalen 2011), *Protea cynaroides* (Denman et al. 2003), *Pyrus communis* (Gadgil et al. 2005), *Pyrus pyrifolia* (Gadgil et al. 2005), *Quercus robur* (Barradas et al. 2013), *Rhododendron* sp. (Varela et al. 2011), *Salix fragilis* (Cunnington et al. 2007), *Salix magnifica* (Gadgil et al. 2005), *Sophora japonica* (Phillips et al. 2002), *Syzygium cordatum* (Pavlic et al. 2007), *Vitis vinifera* (van Niekerk et al. 2004, Úrbez-Torres et al. 2006b).

Known distribution: eastern Australia (Denman et al. 2003, Cunnington et al. 2007, Sergeeva et al. 2009), USA (California)

(Úrbez-Torres et al. 2006b, McDonald & Eskalen 2011, Mayorquin et al. 2012), Italy (Lazzizzera et al. 2008), New Zealand (Gadgil et al. 2005, Pennycook & Samuels 1985), Portugal (Phillips et al. 2002, Alves et al. 2013, Barradas et al. 2013), South Africa (Denman et al. 2003, van Niekerk et al. 2004, Pavlic et al. 2007), Spain (Varela et al. 2011), Uruguay (Pérez et al. 2010).

Notes: The morphology of the conidiomata varies depending on the substrate on which this species is found. Thus, Phillips et al. (2002) reported that on grapevine canes they were thick-walled and eustromatic while on leaves they were thin-walled and globose. Phylogenetically it groups with *N. australe*. See notes for *N. australe*.

Neofusicoccum macroclavatum (T.I. Burgess, Barber & Hardy) T.I. Burgess, Barber & Hardy, Stud. Mycol. 55: 248. 2006. MycoBank MB500877. See Burgess et al. (2005) for illustrations.

Basionym: *Fusicoccum macroclavatum* T.I. Burgess, Barber & Hardy, Austral. Pl. Pathol. 34: 562. 2005.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, formed on water agar on sterilised pine needles within 21 d, superficial, globose, mostly solitary, 1–2 mm diam, covered with mycelium, single or multiloculate. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, sub-cylindrical to cylindrical to ampuliform, proliferating percurrently with up to 2 annellations, (4.5–)5.5–10.5(–13) × 2–3.5(–4.5) µm.

Conidia produced in culture on pine needles elongate-clavate to fusiform, base subtruncate to bluntly rounded, hyaline, unicellular, occasionally 1–4-septate when mature or before germination, smooth wall with fine granular contents, (19–)25–35(–41) × (5–)6–8(–10) µm (av. of 125 conidia = 30.3 × 7.1 µm), L/W = 4.2. *Spermatia* observed in culture hyaline, cylindrical, sub-cylindrical or clavate, base truncate with rounded apex, 4.5–9.5(–13) × 2–3.5(–4.5) µm (av. of 50 spermatia = 7.7 × 2.6 µm). *Dichomera* synasexual morph not reported.

Culture characteristics: Colonies on half strength PDA initially white to buff turning olivaceous-grey within 7 d and becoming black with age, moderately dense, appressed mycelial mat with irregular very dense aerial aggregations. Optimum temperature for growth 25 °C, reaching 53 mm in diameter on half strength PDA after 4 d at 25 °C in the dark.

Type: Australia, Western Australia, Denmark, from wood of living *Eucalyptus globulus*, Oct. 2002, T.I. Burgess, **holotype** MURU 400.

Cultures: WAC 12444 = CBS 118223 (ex-type), WAC 12445 = CMW 15948.

Hosts: *Eucalyptus globulus*, *E. saligna* (Burgess *et al.* 2005).

Known distribution: Western Australia (Burgess *et al.* 2005).

Notes: Phylogenetically *N. macroclavatum* is closely related to *N. andinum*, *N. nonquaesitum* and *N. arbuti*. It can be distinguished from all other species in *Neofusicoccum* on the characteristic shape of its conidia that are considerably larger than most other known species in this genus; only *N. pennatisporum* has longer conidia.

Neofusicoccum mangiferae (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Stud. Mycol.* 55: 248. 2006. MycoBank MB500878. See Slippers *et al.* (2005) for illustrations.

Basionym: *Dothiorella mangiferae* Syd. & P. Syd., *Ann. Mycol.*, 14: 192. 1916.

≡ *Natrassia mangiferae* (Syd. & P. Syd.) B. Sutton & Dyko, *Mycol. Res.* 93: 484. 1989.

≡ *Fusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Johnson, Slippers & M.J. Wingf., *Mycologia* 97 (1): 106. 2005.

≡ *Fusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) G.I. Johnson, Slippers & M.J. Wingf. (as "*mangiferum*"), *Mycologia* 97 (1): 106. 2005.

= *Hendersonula cypria* Natrass, *A first list of Cyprus fungi*: 43. 1937.

= *Exosporina fawcettii* E.E. Wilson, *Hilgardia* 17 (12): 427. 1947.

Ascomata not reported. **Conidiomata** stromatic, erumpent, dark brown to black, uni- to multi-loculate; walls composed of thick-walled, brown *textura angularis*, locules opening by means of separate ostioles; spherical, 150–400 µm diam. **Conidiophores** absent. **Conidiogenous cells** lageniform to ampulliform, hyaline, discrete, arising from the inner wall of the stroma, producing a succession of conidia at one level, collarete absent, periclinal thickening and cytoplasmic channel wide, 6.5–14 × 2.5–4 µm. **Conidia** holoblastic, ellipsoid to nearly fusiform, at first aseptate, then becoming 1–2 euseptate, central cell dark brown, end cells hyaline to pale brown, smooth (11–)12–15(–17.5) × 5–6.6 µm (av. of 54 conidia = 13.6 × 5.4 µm).

Type: India, Lucknow, on *Mangifera indica*, F. Bahadur (E.J. Butler 1724), 22 Oct. 1908, **holotype** HClO.

Cultures: Cultures linked to the type could not be located and probably do not exist. Slippers *et al.* (2005) regarded the following as representatives: CBS 118531 = CMW7024, CBS 118532 = CMW7797.

Host: *Mangifera indica* (Slippers *et al.* 2005).

Known distribution: Australia, India (Slippers *et al.* 2005).

Notes: Phylogenetically this species is closely related to *N. eucalypticola* and *N. eucalyptorum*, but the conidia of *N. mangiferae* are distinct from all other *Neofusicoccum* spp. in their shorter average length (~13–14 µm) and smaller length/width ratio (2–2.5). The conidia often become 1- or 2-septate, light brown with distinctly darker middle cells. This feature is shared with *N. parvum* and *N. mediterraneum*, but is not seen in all isolates of these two latter species.

Neofusicoccum mediterraneum Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips, *Fungal Planet* No. 19: 2. 2007. MycoBank MB504461. Fig. 56.

Ascomata not reported. **Conidiomata** amphigenous, stromatic, brown, up to 450 µm diam on pine needles, ostiolate, exuding conidia in a white mucoid mass, wall consisting of 3–5 layers of brown *textura angularis*. **Conidiophores** lining the inner layer of the conidioma, hyaline, smooth, 0–1-septate, 15–40 × 3–5 µm. **Conidiogenous cells** holoblastic, hyaline, integrated, phialidic, subcylindrical, rarely ampulliform, proliferating several times percurrently near apex, rarely with minute periclinal thickening, 15–30 × 3–5 µm. **Conidia** hyaline, smooth, thin-walled, fusoid-ellipsoidal, widest in the middle or in the upper third, apex subobtuse, base subtruncate, somewhat flattened with minute marginal frill, with granular cytoplasm, (19–)22–26(–27) × (5.5–)6(–6.5) µm *in vitro* (av. size of conidia = 24 × 6 µm), L/W = 4. **Spermatia** not reported. **Dichomera** synasexual morph not reported.

Culture characteristics: Colonies on 2 % MEA fluffy, iron-grey, with abundant grey aerial mycelium, fertile on water agar overlaid with autoclaved pine needles.

Type: Greece, Rhodes, Rhodos Palace Hotel parking lot, on branches and leaves of *Eucalyptus* sp., 12 Jun. 2006, collected by P.W. Crous, M.J. Wingfield & A.J.L. Phillips, **holotype** CBS H-19921.

Cultures: CBS 121718 (ex-type), CBS 121558.

Hosts: *Citrus* sp. (Inderbitzin *et al.* 2010, Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Ficus microcarpa* (Mayorquin *et al.* 2012), *Fortunella* sp., *Fraxinus* sp., *Juniperus* sp., *Persea americana*, *Pistacia vera*, *Prunus dulcis*, *Rubus* sp., *Sequoiadendron giganteum* (Inderbitzin *et al.* 2010), *Eucalyptus* (Crous *et al.* 2007, Inderbitzin *et al.* 2010), *Juglans regia* (Inderbitzin *et al.* 2010, Trouillas *et al.* 2010), *Mangifera indica* (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Olea europaea* (Lazzizzera *et al.* 2008), *Vitis vinifera* (Úrbez-Torres *et al.* 2010, Inderbitzin *et al.* 2010, Martin *et al.* 2011, Pintos Varela *et al.* 2011).

Known distribution: USA (California) (Úrbez-Torres *et al.* 2010, Trouillas *et al.* 2010, Inderbitzin *et al.* 2010, Mayorquin *et al.* 2012),

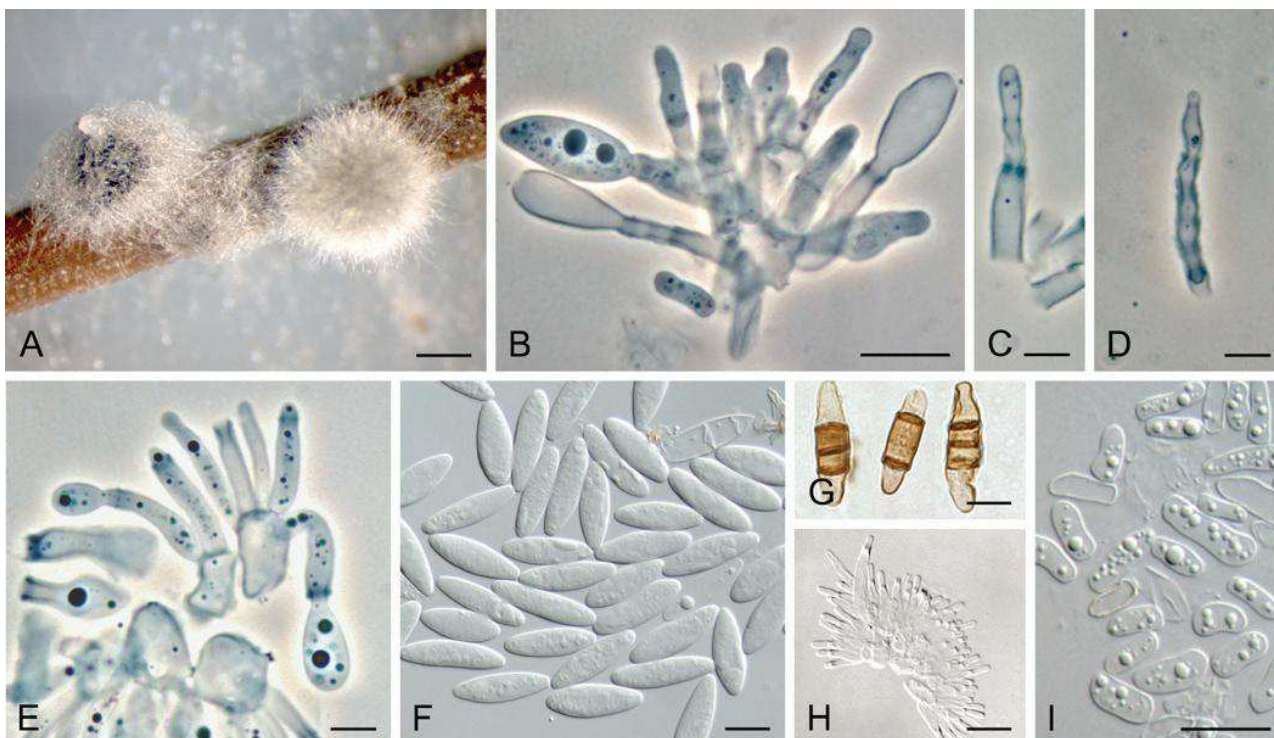


Fig. 56. *Neofusicoccum mediterraneum*. A. Conidiomata formed in culture on poplar twig. B–E. Conidiogenous cells. F. Hyaline, aseptate conidia. G. Coloured, septate conidia. H. Spermatogenous cells. I. Spermatia. Scale bars: A = 500 μ m, B, F–H = 10 μ m, C–E, I = 5 μ m.

Greece (Crous *et al.* 2007), Iran (Abdollahzadeh *et al.* 2013), Italy (Lazzizzera *et al.* 2008), Spain (Martin *et al.* 2011, Pintos Varela *et al.* 2011).

Notes: *Neofusicoccum mediterraneum* is phylogenetically most closely related to *N. viticlavatum* and *N. vitifusiforme*, but it can be separated by having larger conidia (24 \times 6 μ m) than those of *N. viticlavatum* (16–18 \times 6.5–7.5 μ m) and *N. vitifusiforme* (19–21 \times 5.5–6.5 μ m). Conidia in some isolates become septate, light brown with distinctly darker middle cells; a feature seen in *N. mangiferum* and *N. parvum*, but can be distinguished from these two species in having larger conidia.

A search of GenBank revealed a wide range of variation amongst the ITS sequences for isolates of *N. mediterraneum*. Furthermore, in the six-locus phylogeny of Inderbitzin *et al.* (2010), two distinct clades were resolved for this species. Therefore, as mentioned by Abdollahzadeh *et al.* (2013), it seems that *N. mediterraneum* is a complex of species that should be examined in more detail using greater numbers of isolates and additional gene loci.

Neofusicoccum nonquaesitum Inderb., Trouillas, Bostock & Michailides, *Mycologia* 102: 1360. 2010. MycoBank MB518135. See Inderbitzin *et al.* (2010) for illustrations.

Ascomata not reported. **Conidiomata** stromatic, single or in groups, immersed or immersed-erumpent, lenticular to subglobose, 200–500 \times 150–400 μ m, sometimes with a short neck, wall up to 50 μ m wide, three-layered, outer layer composed of dark, thick-walled cells, intermediate layer lighter pigmented, cells smaller, inner layer hyaline, cells thin-walled. **Conidiophores** short, undifferentiated, originating from the inner pycnidial wall, branching at times, up to 30

μ m long, 1.5–2 μ m wide, bearing single, unbranched conidiogenous cells, of similar dimensions as conidiophores. **Conidiogenous cells** holoblastic proliferating percurrently with up to five proliferations. **Conidia** hyaline, fusiform to oval, base truncate, rarely 1–3-septate, sometimes becoming pigmented, 17–29 \times 5.5–10.5 μ m (av. size of conidia = 23.2 \times 7.6 μ m), L/W ratio = 3.1. **Spermatia** when present most abundant in upper part of pycnidium, cylindrical, with rounded or truncate apices, curved at times, 4–10 \times 2–4 μ m, rarely up to 15 \times 5 μ m. **Dichomera** synasexual morph not reported.

Culture characteristics: Colonies on half strength PDA plate with cork oak or pistachio leaf after 12 d under continuous light on a laboratory bench white to olive-brown or olivaceous-black, reverse white to olivaceous-black, conidioma forming mainly on leaf, black, some covered by mycelium, immersed-erumpent, up to 600 μ m diam and of variable shape, conidia and spermatia present.

Type: USA, California, Napa County, St Helena, on cankered branch of *Umbellularia californica*, 12 Nov. 2004, F.P. Trouillas, **holotype** UC1946389 (dried branch of *U. californica* inoculated with PD484).

Cultures: CBS 126655 = PD484 (ex-type), PD301.

Hosts: *Umbellularia californica*, *Prunus dulcis* (Inderbitzin *et al.* 2010), *Vaccinium corymbosum* (Espinoza *et al.* 2009) *Sequoiadendron giganteum* (Rooney-Latham *et al.* 2012).

Known distribution: USA (California) (Inderbitzin *et al.* 2010), Chile (Espinoza *et al.* 2009), North America (Rooney-Latham *et al.* 2012).

Note: See notes for *N. andinum*.

Neofusicoccum occulatum Sakalidis & T.I. Burgess, Mol. Phylogenet. Evol. 60: 340. 2011. MycoBank MB518777. See Sakalidis *et al.* (2011) for illustrations.

Ascomata not reported. *Conidiomata* on *Populus* sp. twigs stromatic, solitary often or in groups, rapidly covered with mycelium, superficial, conical or spherical or obpyriform, unilocular. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, oval to fusiform, 4–14 × 0.5–2.5 µm (av. size = 8 × 1 µm). *Conidia* hyaline, unicellular, fusiform to ellipsoid to cymbiform, apices obtuse, base truncate, sometime both apices taper, aseptate, smooth-walled, 14–22 × 3.5–7.5 µm (av. size of conidia = 18.3 × 5.2 µm), L/W = 3.5. *Dichomera* synasexual morph: *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, globose to turbinate 11.5 × 1.5 µm. *Conidia* two forms observed “irregular long” and “irregular round” both brown and muriform “irregular round” 1–3 transverse septa, 0–1 long septa and 0–3 oblique septa, 7.5–13.5 × 5.5–8.5 µm (av. size of conidia = 9.8 × 7 µm), L/W = 1.4, rarely found “irregular long” 1–5 transverse septa, 0–2 oblique septa, 11.5–20.5 × 4–7.5 µm (av. of 20 conidia = 15.5 × 5.8 µm), L/W = 2.7.

Culture characteristics: Colonies white, flattened with tufts of white mycelium, becoming very to dark greenish grey colour after 14 d with the reverse side of the colonies greenish black. Optimal temperature for growth 30 °C, covering a 90 mm Petri dish on MEA in 3–4 d, limited growth occurred at 4 °C and 10 °C.

Type: **Australia**, Queensland, Karanda, symptomless branches of *Eucalyptus grandis* hybrid, Mar 2002, T.I. Burgess, dried culture sporulating on *Populus* sp. twigs, **holotype** MURU467.

Cultures: MUCC 227 = CBS 128008 (ex-type), MUCC 286 = WAC 12395.

Host: *Eucalyptus* (Sakalidis *et al.* 2011).

Known distribution: Australia (Sakalidis *et al.* 2011).

Notes: A pale yellowish pigment was observed once in the media of three isolates MUCC 270 and MUCC 296 and MUCC 232 (Sakalidis *et al.* 2011). *Neofusicoccum occulatum* is morphologically similar to other closely related species in the *N. parvum* / *N. ribis* species complex and differs from other species in the complex by one uniquely fixed nucleotide difference in partial EF1-α (EU339509) position 164 (A). See notes for *N. cordaticola*.

Neofusicoccum parvum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Stud. Mycol. 55: 248. 2006. MycoBank MB500879. Fig. 57.

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

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

Ascomata forming botryose clusters 2–5 mm diam, each comprising up to 100 ascomata, erumpent through the bark, globose, with a short, conical papilla, dark brown to black, smooth, thick-walled, wall composed of dark brown thick-walled cells, lined with thin-walled, hyaline cells, locules 150–250 µm diam, contents conspicuously white when dry. *Asci* clavate, 8-spored, bitunicate, 75–143(–210) × 17–21 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to fusoid, often with

an apiculus at each end, hyaline, smooth, aseptate, occasionally becoming 1-septate, (14–)18–23(–26) × (7–)8–10(–11) µm (av. of 73 ascospores = 20.8 × 9.2 µm), L/W = 2.2. *Conidiomatal* aggregates morphologically indistinguishable from ascomatal aggregates. *Conidiomata* globose and non-papillate to pyriform with a short, acute papilla, entire locule lined with conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, subcylindrical, proliferating percurrently to form 1–2 annellations, or proliferating at the same level to form periclinal thickenings. *Conidia* ellipsoidal with apex round and base flat, unicellular, hyaline, old conidia becoming 1–2-septate hyaline, or light brown with the middle cell darker than the terminal cells, (12–)13.5–21(–24) × 4–6(–10) µm, 95 % confidence limits of 320 conidia = 16.9–17.3 × 5.4–5.6 µm (av. ± S.D. of 320 conidia = 17.1 ± 2.1 × 5.5 ± 0.8 µm), L/W ratio = 3.2 ± 0.6 with 95 % confidence limits of 3.1–3.2. *Dichomera* synasexual morph: *Conidia* subglobose to obpyriform, brown, apex obtuse, base truncate, 8–10.5(–12) × (6.5–)7–8(–9) µm, 1–3 transverse septa, 1–2 longitudinal septa, and 1–2 oblique septa.

Type: **New Zealand**, Bay of Plenty, Te Puke, No 3 Road, Baldwin Orchard, on small dead branch of *Populus nigra*, 17 Dec. 1981, S.R. Pennycook, **holotype** PDD 45438.

Cultures: PDDCC 8003 = ATCC 58191 (ex-type) = ICMP 8003 = CMW 9081.

Hosts: Plurivorous including *Actinidia deliciosa* (Pennycook & Samuels 1985, Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Araucaria heterophylla* (Slippers *et al.* 2005b), *Citrus sinensis* (Cunnington *et al.* 2007), *Citrus* sp. (Adesemoye *et al.* 2011), *Cupressus funebris* (Li *et al.* 2010), *Diospyros kaki* (Gadgil *et al.* 2005), *Eriobotrya japonica* (Gadgil *et al.* 2005), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna* (Gezahgne *et al.* 2004), *Eucalyptus pellita* (Barber *et al.* 2005), *Eucalyptus urophylla* (Mohali *et al.* 2007), *Ficus microcarpa* (Mayorquin *et al.* 2012), *Grevillea robusta* (Toljander *et al.* 2007), *Heteropyxis natalensis* (Slippers *et al.* 2004a), *Juglans regia* (Inderbitzin *et al.* 2010, Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Juniperus communis*, *Pinus pinea*, *Thuja plicata*, *Thujopsis dolabrata* (Alves *et al.* 2013), *Kolkwitzia amabilis* (Cunnington *et al.* 2007), *Leucadendron* sp. (Marincowitz *et al.* 2008), *Leucospermum* sp. (Marincowitz *et al.* 2008), *Lilium lancifolium* (Woodward *et al.* 2006), *Malus domestica* (Pennycook & Samuels 1985), *Mangifera indica* (Javier-Alva *et al.* 2009), *Olea africana* (Cunnington *et al.* 2007), *Olea europaea* (Lazzizzera *et al.* 2008), *Persea americana* (Hartill 1991, Cunningham *et al.* 2007, Zea-Bonilla *et al.* 2007, McDonald & Eskalen 2011, Molina-Gayosso *et al.* 2012), *Pistacia vera* (Cunnington *et al.* 2007, Inderbitzin *et al.* 2010), *Populus* sp. (Gadgil *et al.* 2005), *Protea cynaroides* (Marincowitz *et al.* 2008), *Prunus armeniaca* (Gramaje *et al.* 2012), *Prunus dulcis* (Inderbitzin *et al.* 2010), *Prunus persica* (Cunnington *et al.* 2007), *Prunus avium* (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Pseudopanax laetus* (Gadgil *et al.* 2005), *Psidium guajava* (Mohali *et al.* 2007), *Pyrus* sp. (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Pyrus communis* (Gadgil *et al.* 2005), *Pyrus pyrifolia* (Shen *et al.* 2010), *Pinus* sp. (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Quercus suber* (Linaldeddu *et al.* 2007), *Rhododendron* sp. (Varela *et al.* 2011), *Ribes* sp. (Slippers *et al.* 2004a), *Rubus fruticosus* (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Salix* sp. (Abdollahzadeh *et al.* 2013), *Sequoia gigantea* (Slippers *et al.* 2004a), *Syzygium cordatum* (Pavlic *et al.* 2007), *Syzygium paniculatum* (Ploetz *et al.* 2008), *Terminalia catappa* (Didier Begoude *et al.* 2010), *Trachycarpus fortunei* (Taylor & Hyde 2003), unknown, palm (Taylor & Hyde 2003), *Vaccinium*

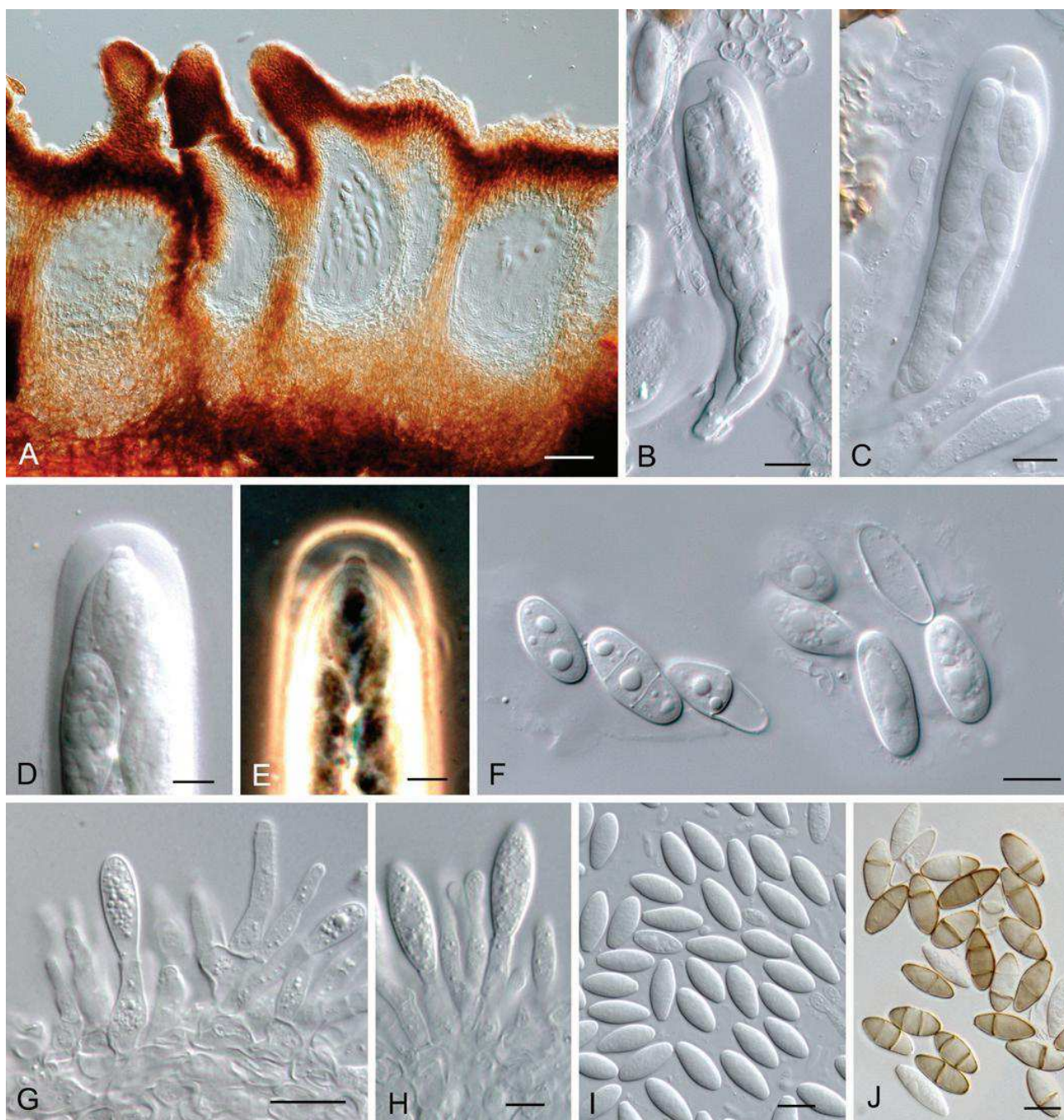


Fig. 57. *Neofusicoccum parvum*. A. Vertical section through an aggregate ascoma. B, C. Asci. D, E. Details of ascus apex as seen by interference contrast (D) or phase contrast (E). F. Ascospores. G, H. Conidiogenous cells. I. Hyaline, aseptate conidia. J. Coloured, 1- and 2-septate conidia. Scale bars: A = 50 μ m, B, C, F, G = 10 μ m, D, E, H–J = 5 μ m.

corymbosum (Espinoza *et al.* 2009), *Vitis vinifera* (Cunnington *et al.* 2007, Mohammadi *et al.* 2008, Phillips, *et al.* 2006, Úrbez-Torres *et al.* 2006, Díaz *et al.* 2011, White *et al.* 2011).

Known distribution: Probably worldwide. Australia (Barber *et al.* 2005, Cunnington *et al.* 2007, Slippers *et al.* 2004a, Taylor & Hyde 2003), USA (California) (Úrbez-Torres *et al.* 2006b, Adesemoye & Eskalen 2011, Inderbitzin *et al.* 2010, McDonald & Eskalen 2011, Mayorquin *et al.* 2012), Chile (Díaz *et al.* 2011, Espinoza *et al.* 2009), China (Li *et al.* 2010, Taylor & Hyde 2003), Ethiopia (Gezahgne *et al.* 2004), USA (Florida) (Ploetz *et al.* 2008), USA (Georgia) (Woodward *et al.* 2006), Greece (Inderbitzin *et al.* 2010), USA (Hawaii) (Marincowitz *et al.* 2008), Iran (Mohammadi *et al.*

2008, Abdollahzadeh *et al.* 2013), Italy (Lazzizzera *et al.* 2008, Linaldeddu *et al.* 2007), Mexico (Molina-Gayosso *et al.* 2012), New Zealand (Gadgil *et al.* 2005, Hartill 1991, Pennycook & Samuels 1985, Slippers *et al.* 2005b), Peru (Javier-Alva *et al.* 2009), Portugal (Phillips *et al.* 2006, Alves *et al.* 2013), South Africa (Didier Begoude *et al.* 2010, Pavlic *et al.* 2007, Slippers *et al.* 2004a, Slippers *et al.* 2004b, White *et al.* 2011), Spain (Úrbez-Torres *et al.* 2006a, Zea-Bonilla *et al.* 2007, Varela *et al.* 2011, Gramaje *et al.* 2012), Taiwan (Shen *et al.* 2010), Uganda (Toljander *et al.* 2007), Venezuela (Mohali *et al.* 2007).

Notes: Phylogenetically, this species lies within a cluster of morphologically highly similar species that can be distinguished

only on the basis of ITS and EF1- α sequence data. *Neofusicoccum parvum* has, however, been distinguished by different researchers from other species in this cluster based on the colour and septation of conidia at the time of germination. Thus, the conidia become 2-septate and the central cells become pale brown in *N. parvum*, while in the other species there is no colouration of the conidia at the time of germination. But recently, in a phylogenetic study on *Neofusicoccum* and *Botryosphaeria* species in Iran, Abdollahzadeh *et al.* (2013) studied 34 *N. parvum* isolates and found that in all of them the old conidia remained hyaline even after 10 wk. Furthermore, the production of a yellow pigment on PDA was reported in some isolates of an Iranian population of *N. parvum*, which is a feature never seen previously. *Neofusicoccum parvum* is emerging as a common and cosmopolitan species on a wide variety of hosts. It is now recognised as an aggressive pathogen of grapevines (e.g., Phillips 1998) as *B. dothidea*, van Niekerk *et al.* (2004), and possibly other woody hosts.

Neofusicoccum pennatisporum K. Taylor, Barber & T.I. Burgess, Mycol. Res. 113: 346. 2009. MycoBank MB511826. See Taylor *et al.* (2009) for illustrations.

Ascomata not reported. *Conidiomata* stromatic, superficial, dark-brown to black, cylindrical to triangular to irregular, mostly solitary, rough with some mycelium, 300–1000 μm long and 100–500 μm diam on pine needles but up to 2 mm long on agar. *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, cylindrical to flask shaped, 4–10(–12) \times (1–)2–3(–4) μm . *Conidia* hyaline, usually aseptate, often with 1 septum but can have up to 5 septa with age, typically fusiform, smooth-walled, apex obtuse, base frequently truncate but sometimes rounded, (31–)40–50(–64) \times 6–10 (–12) μm (av. of 100 conidia = 45.4 \times 9.7 μm), L/W ratio = 4.6. *Spermatia* hyaline, aseptate, fusiform, either rounded or truncate at both ends, (2–)3–6(–7) \times 1–2 μm (av. of 100 spermatia = 4.4 \times 1.5 μm). *Dichomera* synasexual morph not reported.

Culture characteristics: Colonies composed of appressed mycelial mat with diffuse irregular edges, white centre, darkening slightly with age, pycnidia produced profusely.

Type: **Australia**, Western Australia, Yalgorup National Park, from healthy stem of *Allocasuarina fraseriana*, Jun. 2005, K.M. Taylor, **holotype** PERTH 07693044.

Cultures: WAC 13153 = MUCC 510 (ex-type).

Host: *Allocasuarina fraseriana* (Taylor *et al.* 2009).

Known distribution: Western Australia (Taylor *et al.* 2009).

Notes: The conidia of *N. pennatisporum* are unusually long (40–50 \times 6–10 μm), when compared with other *Neofusicoccum* spp., including *N. macroclavatum* (25–35 \times 6–8 μm), which is also found in Western Australia, and *N. protearum* (25–30 \times 7–8 μm), which is the most closely related species to *N. pennatisporum* based on ITS sequence data. In the phylogeny based on ITS and EF1- α sequences, this species resides in a distinct clade as a sister group to all other *Neofusicoccum* species. According to Taylor *et al.* (2009), an isolate of *N. pennatisporum* produced the sexual morph once on pine needles in culture. The ascospores have distinctive

protrusions at either end unlike ascospores of other *Neofusicoccum* spp.

Neofusicoccum protearum (Denman & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Stud. Mycol. 55: 249. 2006. MycoBank MB500880. See Denman *et al.* (2003) for illustrations.

Basionym: *Fusicoccum protearum* Denman & Crous, *Mycologia* 95: 301. 2003.

= *Botryosphaeria protearum* Denman & Crous, *Mycologia* 95: 301. 2003.

Ascomata pseudothecial, embedded in host tissue, up to 600 μm diam, becoming erumpent, solitary or botryose, stromatic, dark brown to black, with central, black ostioles; pseudothecial wall 6–15 layers thick, composed of brown *textura angularis*. *Asci* clavate to subcylindrical, 8-spored, bitunicate, with a well-developed apical chamber that becomes inconspicuous at maturity, 110–200 \times 15–21 μm . *Pseudoparaphyses* filiform, branched, septate, 3–5 μm wide. *Ascospores* irregularly biserial, hyaline, nonseptate, granular, becoming light brown with age, fusiform, widest in the middle with obtuse ends, sometimes inequilateral, (25–)26–33(–37) \times (9–)10–12(–13) μm . *Conidiomata* stromatic, embedded in host tissue, solitary or botryose, stromatic, globose, up to 500 μm diam, wall 4–8 layers thick, composed of brown *textura angularis*, becoming hyaline towards the inner region. *Conidiophores* 0–1-septate, hyaline, subcylindrical, rarely branched, 7–20(–30) \times 3–5 μm . *Conidiogenous cells* holoblastic, hyaline, subcylindrical, rarely proliferating percurrently with 1–2 anellations, proliferating predominantly at the same level with minute periclinal thickenings, which become more prominent in older conidiogenous cells, 7–12 \times 3–5 μm . *Conidia* hyaline, granular, ovoid to clavate when young, becoming irregularly fusoid when mature, widest in the middle with an obtuse apex and bluntly rounded or slightly flattened base, (20–)25–30(–40) \times 7–8(–10) μm *in vivo*. *Spermatia* produced in same conidiomata as conidia, or in separate conidiomata. *Spermatophores* hyaline, smooth, branched, cylindrical, 0–2-septate, straight, unbranched or branched above, 12–17 \times 2–3 μm . *Spermatogenous cells* discrete or integrated, hyaline, smooth, cylindrical, proliferating via phialides with periclinal thickenings, 5–12 \times 1.5–2.5 μm . *Spermatia* hyaline, smooth, aseptate, rod-shaped with rounded ends, 3–6 \times 1–1.5 μm . *Dichomera* synasexual morph not reported.

Type: Of sexual morph: **South Africa**, Western Cape, Porterville, Baanbreek Farm, on stems of *Protea magnifica*, 27 Jul. 1997, S. Denman, **holotype** PREM 57329; of asexual morph: **South Africa**, Western Cape, Devon Valley, Protea Heights Farm, on stems of *Leucadendron salignum*, 31 Oct. 1997, S. Denman & J. Taylor, **holotype** PREM 57330.

Cultures: STE-U 4361 = CPC 4361 (ex-type culture of sexual morph), STE-U 1775 = CBS 114176 (ex-type culture of asexual morph).

Hosts: *Protea* and *Leucadendron* spp. (Denman *et al.* 2000, 2003, Marincowitz *et al.* 2008), *Santalum acuminatum* (Taylor *et al.* 2009).

Known distribution: Australia, Portugal (continental and Madeira), South Africa, Spain (Tenerife), USA (Hawaii) (Denman *et al.* 2000, 2003, Marincowitz *et al.* 2008, Taylor *et al.* 2009).