

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

Memoria de Título

**SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.) A *Diplodia mutila*
(Fr.) Mont.**

MAURICIO ANDRÉS RAMÍREZ FLORES

Santiago, Chile

2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

Memoria de Título

**SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.) A *Diplodia mutila*
(Fr.) Mont.**

**SUSCEPTIBILITY OF GRAPEVINE CULTIVARS (*Vitis vinifera* L.) TO *Diplodia*
mutila (Fr.) Mont.**

MAURICIO ANDRÉS RAMÍREZ FLORES

Santiago, Chile

2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.) A *Diplodia munita*
(Fr.) Mont.**

**Memoria para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo**

MAURICIO ANDRÉS RAMÍREZ FLORES

| Profesor Guía | Calificaciones |
|---|-----------------------|
| Sr. Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo | 6,1 |
| Profesores Evaluadores | |
| Sr. Jaime G. Auger S. Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Ph. D. | 5,5 |
| Sr. Ricardo A. Pertuzé C. Ingeniero Agrónomo, Ph. D. | 4,7 |

Santiago, Chile

2014

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Sr. Jaime Montealegre que siempre estuvo en el desarrollo de esta memoria, por sus conocimientos, consejos, paciencia, apoyo y comprensión.

A mis profesores evaluadores Sr. Jaime Auger y Sr. Ricardo Pertuzé por sus aportes en la elaboración de esta investigación.

A Sra. Luz María Pérez por su ayuda en la redacción del documento.

A mis compañeras y amigas de laboratorio por su apoyo en aquellos momentos en que más los necesitaba; Danae y Valeria.

A mis hermanos y abuelos por creer en mí hasta el final a pesar de todo.

Y en especial agradeceré enteramente a mi Madre que en paz descansa por darme la vida, cariño, preocupación y dedicarme una gran parte de su vida.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------|----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Objetivo..... | 7 |
| Materiales y Método..... | 8 |
| Origen del aislado del patógeno..... | 8 |
| Material vegetal..... | 8 |
| Tratamientos y diseño..... | 9 |
| Prueba de susceptibilidad..... | 9 |
| Diseño de ensayos..... | 9 |
| Descripción de los ensayos..... | 10 |
| Evaluación..... | 10 |
| Análisis estadístico..... | 11 |
| Resultados y Discusión..... | 12 |
| Cultivares viníferos..... | 13 |
| Cultivares de mesa..... | 14 |
| Cultivares viníferos y de mesa..... | 15 |
| Otras consideraciones..... | 16 |
| Conclusiones..... | 17 |
| Bibliografía..... | 18 |
| Apéndices..... | 24 |
| Anexos..... | 25 |

RESUMEN

La frecuencia de síntomas debido al ataque de hongos de la madera de la vid, ha aumentado significativamente en todo el mundo durante la última década. Las especies fungosas de la familia Botryosphaeriaceae provocan la muerte parcial de la planta, disminuyendo la productividad y la rentabilidad del cultivo. Una de las especies presentes en Chile es *Diplodia mutila*, asociada principalmente a la enfermedad del brazo muerto de la vid. El objetivo de esta investigación fue evaluar la susceptibilidad de sarmientos de cultivares de vid vinífera (Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Sauvignon Blanc y Syrah) y de mesa (Crimson Seedless, Flame Seedless, Red Globe y Thompson Seedless) a *D. mutila*. Para ello, se realizó un ensayo “*in vivo*” usando sarmientos de un año, los cuales fueron inoculados con discos de agar con micelio de *D. mutila*, en el sector medio del entrenudo después de producir una herida. Los sarmientos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento durante cuatro a seis semanas, en oscuridad, a una humedad relativa del 95% y a una temperatura de 25°C. Se consideraron 10 repeticiones por cultivar y al término del período de incubación, se evaluó la longitud de la lesión necrótica en forma independiente, en los cultivares viníferos y de mesa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la susceptibilidad de los cultivares viníferos y de mesa investigados, los que en su totalidad fueron susceptibles al patógeno.

Palabras clave: *Botryosphaeria stevensii*, Botryosphaeriaceae, brazo muerto de la vid.

ABSTRACT

The frequency of symptoms associated to fungal attack on grapevine trunk, increased significantly worldwide during the last decade. Fungal species belonging to the Botryosphaeriaceae family are responsible for the death of part of the plant, reducing productivity and profitability of this crop. *Diplodia mutila* is one of the species associated to the dead arm disease of grapevine in Chile. The objective of this research was to evaluate the susceptibility of vine shoots of wine grape cultivars (Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Sauvignon Blanc and Syrah) and table grapes (Crimson Seedless, Flame Seedless, Red Globe and Thompson Seedless) to *D. mutila*. *In vivo* trials were performed using one year old vine shoots, inoculated with mycelia disks of *D. mutila* between the internode after performing a wound. The shoots were kept during four to six weeks in a growth chamber, in the dark, at 95% relative humidity and at 25 ° C. Ten replicates per cultivar were considered, where necrotic lesion length was evaluated. No significant differences were observed on susceptibility among wine and table grape cultivars, being all susceptible to the pathogen.

Key words: *Botryosphaeria stevensii*, Botryosphaeriaceae, dead arm of the grapevine.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años en Chile, las plantaciones con especies frutales han tenido un aumento considerable, siendo la uva de mesa una de las principales con 53.523 hectáreas en producción (ODEPA, 2014a). La uva vinífera ha seguido el mismo comportamiento con una superficie de 128.638 hectáreas, y el sector pisquero con 9.900 hectáreas (ODEPA, 2014b). Dentro del rubro agropecuario, la uva de mesa y vinífera representan uno de los principales ingresos por concepto de exportaciones (ODEPA, 2014c).

Considerando el crecimiento que ha experimentado la industria de la uva, es fundamental que el manejo sanitario de las vides sea el mejor posible, con el fin de maximizar su rentabilidad y vida útil. Las enfermedades causadas por hongos, provocan daños importantes en la vid, causando pérdidas económicas si no se controlan adecuadamente. Estas limitan la longevidad y productividad del cultivo, produciendo un aumento de los costos de manejo. Dentro de las enfermedades importantes que afectan a la vid, se encuentran aquellas producidas por hongos que producen canchales y muerte de brazos (Úrbez-Torres y Gubler, 2009).

Dentro de los hongos que provocan muerte de brazos, se encuentran diferentes especies de hongos del género *Botryosphaeria*. Una de ellas es *Botryosphaeria stevensii*, que al igual que la mayoría de otras especies de este género normalmente se encuentran como su anamorfo *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. (Denman *et al.*, 2000). La primera descripción de este hongo fue realizada por Montagne (1834), aunque hay varios autores que difieren con esta información. Por consenso y gracias a pruebas moleculares se avala la clasificación realizada por Shoemaker (1964). Según De Almeida (2008) la designación del anamorfo *D. mutila* se ha mantenido, y ya no se refiere al telomorfo *B. stevensii*.

El desarrollo del hongo en el medio de cultivo agar papa dextrosa es de abundante micelio aéreo, que inicialmente es de color blanco, pero se convierte en marrón oliváceo muy oscuro después de 5-6 días a 25 °C. Al observar el reverso de los cultivos, el color es casi negro en estados avanzados de desarrollo. *Diplodia mutila* produce conidias con las siguientes características: dimensiones de $(23,5-27) \times (12-14) \mu\text{m}$, hialinas, aseptadas, con una pared gruesa, rara vez toman el color marrón claro; poseen 1 septa y su ápice y base son ampliamente redondeados; la relación largo/ancho es de 1,9 (Véase Anexo I) (Phillips, 2007).

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae provocan enfermedades de la madera en vid, junto a múltiples patógenos que suelen confundirse entre sí (De Almeida, 2008) y cuya sintomatología es múltiple y compleja (Auger *et al.*, 2004; Auger *et al.*, 2005; van Niekerk *et al.*, 2006). Estas enfermedades tienen en común una alteración interna de la madera, lo que a menudo conlleva a la muerte de la planta (Úrbez-Torres y Gubler, 2009).

Diplodia mutila se presenta generalmente en plantas adultas (Cobos, 2008) y se asoció por primera vez a la enfermedad del brazo muerto de la vid (Black Dead Arm o BDA) en Hungría en 1974 (Lehoczky, 1974, citado por Larignon *et al.*, 2001d). Los síntomas asociados son clorosis, marchitez y pudrición de la fruta en algunos casos. En un estado del BDA las hojas se secan completamente, se arrugan y caen, quedando solamente hojas en la parte distal de la rama (Savocchia, 2007). Cuando la enfermedad está muy avanzada, se pueden ver afectadas las inflorescencias e incluso el fruto puede deshidratarse por completo (Larignon y Dubos, 2001a). A nivel externo del tronco, se aprecian partes necróticas, donde el ritidoma aparece suelto y se puede separar fácilmente con la mano (Lecomte *et al.*, 2005). En el xilema de brazos y troncos se observan estrías que se desarrollan y se expanden para formar grandes sectores de necrosis en la madera y en muchas ocasiones tienen forma de cuña (en V) (van Niekerk *et al.*, 2002; van Niekerk *et al.*, 2006). También se asocia con canchales (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) y muerte regresiva (Phillips, 1998; Úrbez-Torres y Gubler, 2009; Morales *et al.*, 2010b), con el síndrome de la declinación en vid (Phillips, 2002; Taylor *et al.*, 2005) y con la esca (Sánchez-Torres *et al.*, 2008). En algunos casos el hongo ha sido aislado desde pequeños puntos negros asociados generalmente con la enfermedad de Petri (Phillips, 2002). En Chile, Morales *et al.*, (2010a) observaron que las hojas presentaban clorosis, necrosis y deformación, y en la madera se observó muerte regresiva del brazo, así como decoloración vascular y canchales en forma de V, presentándose esta última sintomatología en USA en plantas con presencia de muerte regresiva (Úrbez-Torres *et al.*, 2006).

Botryosphaeria stevensii con frecuencia se ha asociado al roble (*Quercus* sp.) en el área del Mediterráneo occidental, provocando daños por canchales (Luque *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2003) y muerte regresiva (Alves *et al.*, 2004). Este hongo se ha informado en numerosas plantas hospederas en el mundo, encontrándose en; *Vitis vinifera* en Portugal (Phillips, 1998; Phillips *et al.*, 2008), en España (Moret y Nadal, 1991; Cobos, 2008), en Francia (Larignon *et al.*, 2001d), en USA (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Úrbez-Torres y Gubler, 2009), en Australia (Taylor *et al.*, 2005; Pitt *et al.*, 2010), Italia (Spagnolo *et al.*, 2011), África del Sur (van Niekerk *et al.*, 2004), Hungría (Lehoczky, 1974, citado por De Almeida, 2008) y Chile (Morales *et al.*, 2010a) entre otros países. También se ha encontrado en otras especies agrícolas (Farr *et al.*, 2008) y ornamentales (Tisserat *et al.*, 1988; Moret y Nadal 1991; Luque *et al.*, 2001; Sidoti y Granata, 2004; Alvarez-Loayza *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008). En Chile, un estudio reciente realizado por Auger *et al.*, (2012) concluyeron que el cultivo del kiwi cumple un rol sumamente importante en la epidemiología de las especies pertenecientes a hongos de la familia Botryosphaeriaceae.

La forma en que este hongo se disemina es principalmente por el agua de lluvia (Amponsah *et al.*, 2010b) y por el aire (Larignon *et al.*, 2001c). Las conidias son más abundantes durante el verano donde las temperaturas son altas (Amponsah *et al.*, 2010b), provocando posibles infecciones debido a las heridas que quedan expuestas por las podas en verde. Al contrario de lo que opinan Sutton (1981) y Pusey (1989) quienes señalan que la liberación de conidias e infecciones son más importantes en invierno con períodos de lluvia y humedad relativa alta. Las condiciones controladas de temperatura y humedad que se han utilizado en estudios bajo invernadero han sido de 28 a 32 °C con un 40% de humedad

relativa (Úrbez-Torres y Gubler, 2009), para darle mejores condiciones de desarrollo al patógeno.

Una entrada habitual de este patógeno a los tejidos del hospedero es a través de heridas que dejan los cortes de poda (Larignon *et al.*, 2001c). Sin embargo, daños mecánicos o naturales pueden ser puntos de entrada utilizados por estos patógenos (Úrbez-Torres y Gubler, 2009). También el material de propagación es una fuente de inóculo (Billones *et al.*, 2010).

En la mayoría de los países las enfermedades de la madera de la vid han ido en aumento, siendo uno de los factores que ha favorecido la presencia de estos agentes causales la supresión de controles químicos más eficientes como el arsenito sódico, que ha sido reemplazado por fungicidas menos eficaces (Chiarappa, 2000; Graniti *et al.*, 2000; Rolshausen *et al.*, 2010). El buen resultado de estas moléculas químicas es complejo, debido a que deben inhibir a una gran cantidad de patógenos involucrados en el problema (Úrbez-Torres, 2011). Las medidas preventivas se han perfilado como la mejor forma para el control de esta enfermedad debido a la ausencia de un producto eficaz tras la prohibición del arsenito sódico. Las prácticas culturales más comunes son la eliminación de los restos de poda y de las plantas afectadas para reducir las fuentes de inóculo (Larignon y Dubos, 2001a), así como la protección de las heridas de poda con fungicidas. Este último manejo puede ser costoso, poco práctico y lavado por precipitaciones (Rolshausen y Gubler, 2005), a llevado a un aumento en la incidencia de la enfermedad. Las podas de saneamiento, para eliminar la madera atacada, pueden ser un método efectivo a largo plazo si se elimina completamente la parte afectada (Di Marco *et al.*, 2000; van Niekerk *et al.*, 2004). Sin embargo, los manejos antes mencionados todavía no son totalmente eficaces (Bertsch *et al.*, 2013). La etapa de propagación de plantas provenientes de viveros, es un proceso crítico en la industria para la obtención de plantas comerciales en buenas condiciones sanitarias (Gramaje y Armengol, 2011; Bertsch *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los viñedos jóvenes se establecen ya infectados de vivero, debido a una contaminación de las plantas madres o durante el proceso de propagación (Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Gramaje y Armengol, 2011; Úrbez-Torres, 2011; Waite, 2013). El establecimiento de plantas con presencia de patógenos y el manejo de viñedos estresados (preparación del suelo inadecuada, incorrecta plantación, el riego inadecuado y deficiencias o excesos nutricionales), acentúan aún más el problema de las enfermedades de la madera en la vid (Gramaje y Armengol, 2011). Todos estos factores mencionados han llevado a un aumento de la propagación e incidencia de estos patógenos.

Existen estudios de patogenicidad en especies de la familia Botryosphaeriaceae sobre distintos tejidos de vid, desde los cuales algunas cepas pueden provocar lesión y otras no.

En Chile Auger *et al.*, (2004) realizaron pruebas de patogenicidad con 16 aislados de *B. obtusa* en el cv. Red Globe, produciendo lesiones todas las cepas inoculadas, a diferencia del control que no produjo la enfermedad. Estos resultados se contradicen con los obtenidos por Taylor *et al.*, (2005), quienes utilizaron sarmientos enraizados del cv. Red Globe los cuales fueron inoculados con 7 cepas de *B. rhodina*, 9 de *B. australis*, 1 *B. stevensii* y 9 de *B. obtusa*, para posteriormente mantenerlos durante 5 semanas en un invernadero. En la

evaluación determinaron que las cepas de *B. obtusa* se comportaron iguales que el control, no produciendo necrosis significativa, al igual que algunas de *B. rhodina* y *B. australis*. Otros estudios llevados a cabo por van Nierkerk *et al.*, (2004), donde realizaron distintos ensayos, coinciden con Taylor *et al.*, (2005), en que ciertas cepas no son patogénicas. Uno de los ensayos consistió en la utilización de sarmientos de los cultivares Chardonnay y Cabernet Sauvignon incubados bajo condición de laboratorio durante 3 semanas, determinándose que las cepas *B. rhodina*, *B. lutea* y *Diplodia porosum* fueron estadísticamente iguales que el control. En el otro ensayo utilizaron un viñedo de 15 años de edad del cultivar Periquita, que mantuvieron brazos inoculados durante 6 meses. En este estudio de campo se percataron que las cepas *D. porosum*, *B. parva* y *Fusicoccum vitifusiforme* fueron estadísticamente igual que el control.

En California, Estados Unidos, Úrbez-Torres y Gubler (2009), realizaron varios estudios de patogenicidad y uno de ellos efectuado en campo con brotes verdes del cv. Red Globe de 7 años de edad y mantenido inoculado durante 5 meses, se observó que dos cepas de *D. mutila* se comportaron iguales que el control, es decir, no fueron patógenas, al igual que las cepas de *Neofusicoccum luteum*, *Dothiorella viticola*, *D. iberica*.

En Nueva Zelanda, Baskarathevan (2011) realizó un ensayo con el cultivar Sauvignon Blanc, en macetas en condiciones de campo (15 a 25 °C), el cual fue mantenido durante 6 semanas. Los resultados obtenidos arrojaron que 3 cepas de *N. parvum* y una de *N. luteum* fueron estadísticamente iguales que el control. Estos resultados se asemejan con los obtenidos por Billones-Baaijens (2011), que utilizó también Sauvignon Blanc, pero en inoculaciones en brotes verdes, mantenidos durante 5 a 7 días en condiciones de laboratorio y en plantas inoculadas (en esta oportunidad la inoculación se efectuó en el extremo, mediante un corte con tijera podadora) durante 28 días bajo invernadero (15 a 25 °C). De los resultados de los brotes verdes y de las plantas, se obtuvo que *D. seriata* y *B. dothidea* respectivamente se comportaron de manera similar al tratamiento control. En España, Martos (2008) concluyó lo mismo con la cepa de *D. seriata*; trabajó con plantas en macetas de los cultivares Macabeo y Tempranillo, que se mantuvieron en invernadero durante 6 meses. Los resultados obtenidos arrojaron que una cepa de *D. seriata* tanto en el cultivar Macabeo como Tempranillo no fue diferente estadísticamente al control. En Francia, Larignon *et al.*, (2001d) obtuvieron los mismos resultados con *D. seriata*, utilizando sarmientos de 1 año de edad del cultivar Cabernet Sauvignon, mantenido durante 21 días a 25°C. Dos cepas de *D. seriata* fueron estadísticamente iguales que el control.

En relación a susceptibilidad varietal a *D. mutila* en vid, se ha observado que existen diferencias acorde con los cultivares en comparación con otras de la familia Botryosphaeriaceae (Larignon y Dubos, 2001b). Úrbez-Torres y Gubler (2009) demostraron que este es un patógeno débil en vid. La misma conclusión se obtuvo en Portugal (Phillips, 1998) y Australia (Taylor *et al.*, 2005). Por el contrario, se ha demostrado ser muy virulento en el sur de África (van Niekerk *et al.*, 2004), reforzando así la idea de que diferentes factores podrían estar involucrados en la variabilidad de la virulencia en especies de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Una investigación ha demostrado que *D. mutila* puede ser capaz de infectar a las vides jóvenes a través de las

raíces y causar muerte regresiva (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2006). Wunderlich *et al.*, (2010) demostraron que es patogénica en bayas a la cosecha. Aunque los análisis de patogenicidad que se han realizado son escasos (Úrbez-Torres y Gubler, 2009), está considerado como un patógeno de vid potencialmente importante (van Niekerk *et al.*, 2004). Recientemente se han efectuado estudios de patogenicidad con *D. mutila* en Chile, dando como resultado que esta especie es más virulenta que otras especies de *Botryosphaeria* (Morales *et al.*, 2010b).

Considerando la importancia del cultivo de la vid en Chile y que los antecedentes sobre susceptibilidad a nivel mundial en cultivares de *Vitis vinífera* son escasos, es que se propone como hipótesis que los distintos cultivares de vid se comportan en forma diferente al ataque de este hongo.

Objetivo

Evaluar la susceptibilidad de sarmientos de cultivares de vid vinífera: Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Sauvignon Blanc y Syrah y de mesa: Crimson Seedless, Flame Seedless, Red Globe y Thompson Seedless a *Diplodia mutila*.

MATERIALES Y MÉTODO

La Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron las instalaciones, materiales y en general el equipamiento del laboratorio antes mencionado.

Origen del Aislado del Patógeno: La cepa de *Diplodia mutila* utilizada fue obtenida de un viñedo de plantas francas del cv. Cabernet Sauvignon, plantado en el año 1992, ubicado en la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana de Chile. La sintomatología observada se reconoció como típica del Brazo muerto de la vid, la cual presentaba la necrosis característica en forma de cuña (V).

La cepa de *D. mutila* utilizada y cuya patogenicidad fue previamente comprobada, correspondió a la N° 894, de la colección micológica del Laboratorio de Microbiología, la cual fue identificada a través de características morfológicas y moleculares (se utilizaron los partidores EF1-688F y EF1-1251R)¹. Esta cepa fue seleccionada de entre otras de la misma especie, considerando sus características de comportamiento representativo *in vitro* respecto a temperatura y pH (Valderrama *et al.*, 2011).

Material Vegetal: Se utilizaron nueve cultivares de vid, incluyendo tanto viníferos como de mesa. Los sarmientos tenían un año de edad, de longitud y diámetro uniformes, provenientes de plantaciones visualmente sanas de la VI Región, para los cultivares de mesa y de la RM para los viníferos; estos se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Cultivares evaluados.

| Cultivares | Patrón |
|-------------------|---------|
| Viníferos | |
| Cabernet Franc | Franco |
| Malbec | Franco |
| Merlot | Franco |
| Sauvignon Blanc | Franco |
| Syrah | Franco |
| De mesa | |
| Crimson Seedless | Harmony |
| Flame Seedless | Harmony |
| Red Globe | Harmony |
| Thompson Seedless | Harmony |

¹ Dr. Josep Armengol. Catedrático. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. 2013. España. (Comunicación personal).

Tratamientos y Diseño

Prueba de Susceptibilidad

Diseño de ensayos: Se realizaron dos ensayos de susceptibilidad de forma independiente; cultivares viníferos (Cuadro 2) y cultivares de mesa (Cuadro 3). Se utilizó un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones para cada tratamiento. Estos correspondieron a cada cultivar de vid evaluado. La unidad experimental correspondió a un sarmiento.

Cuadro 2. Ensayo 1, cultivares viníferos

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|--|
| 1 | Cabernet Franc inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 2 | Malbec inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 3 | Merlot inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 4 | Sauvignon Blanc inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 5 | Syrah inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 6 | Cabernet Franc sin inoculación |
| 7 | Malbec sin inoculación |
| 8 | Merlot sin inoculación |
| 9 | Sauvignon Blanc sin inoculación |
| 10 | Syrah sin inoculación |

Cuadro 3. Ensayo 2, cultivares de mesa

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|--|
| 1 | Crimson Seedless inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 2 | Flame Seedless inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 3 | Red Globe inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 4 | Thompson Seedless inoculado con <i>D. mutila</i> |
| 5 | Crimson Seedless sin inoculación |
| 6 | Flame Seedless sin inoculación |
| 7 | Red Globe sin inoculación |
| 8 | Thompson Seedless sin inoculación |

Descripción de los Ensayos: Para ambos ensayos, previo a la inoculación, el hongo se incubó en placas con agar papa dextrosa (APD) por 7 días (Figura 1A) en una cámara de cultivo a 25 °C (Úrbez-Torres, *et al.*, 2008; Úrbez-Torres y Gubler, 2009).

Los trozos de sarmiento se cortaron con dos nudos y la inoculación se efectuó en la mitad del entrenudo, desinfectando previamente el tejido con etanol al 70% (Savocchia *et al.*, 2007). Se practicó una herida en forma de V con un bisturí (Figura 1B), llegando al tejido vascular (Morales *et al.*, 2010b). La herida se inoculó con un disco de APD de 6 mm de diámetro con micelio del patógeno (Figura 1C). Posteriormente las heridas se cubrieron con Parafilm (Figura 1D). Los sarmientos se pusieron en cámara húmeda (Figura 1E), las que se dejaron en una cámara de cultivo (Savocchia *et al.*, 2007). La temperatura y humedad se registraron en un data logger, el cual registró una temperatura y humedad relativa promedio de 25 °C \pm 0,2 y 95% \pm 1,3 (Véase Apéndice I).

En los sarmientos control solo se usaron discos de APD sin micelio (Figura 1F).

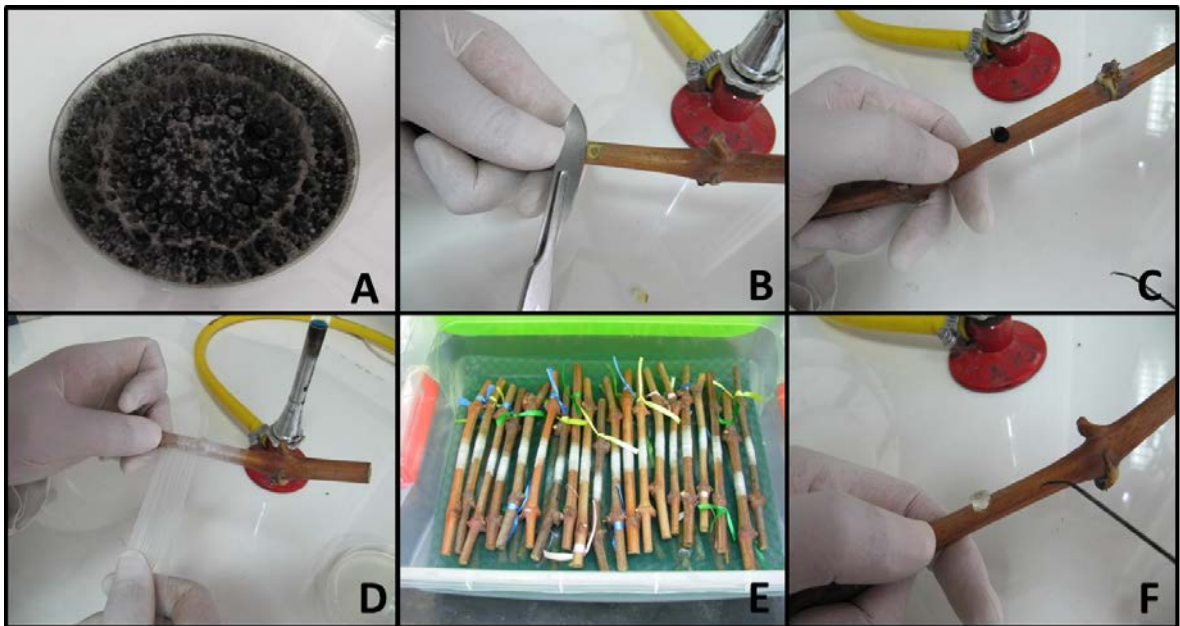


Figura 1. (A) Cepa utilizada. (B) Herida en forma de V. (C) Inoculación de disco de APD con micelio. (D) Sellado con parafilm. (E) Cámara húmeda que se utilizó. (F) Control.

Evaluación: La evaluación se realizó a las 4 semanas de incubación para los cultivares viníferos y a las 6 para los de mesa. Esta diferencia fue debida a que el avance de la necrosis se midió antes que llegara a los nudos (Figura 2A).

Primero se eliminó la corteza de la zona inoculada para una mejor observación del avance de la enfermedad. Posteriormente se procedió a medir con un pie de metro la longitud de la

necrosis a lo largo del entrenudo (Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Úrbez-Torres y Gubler, 2009). La medición se realizó evaluando el tamaño de la lesión tanto hacia arriba como hacia abajo desde el punto de inoculación (Figura 2B).

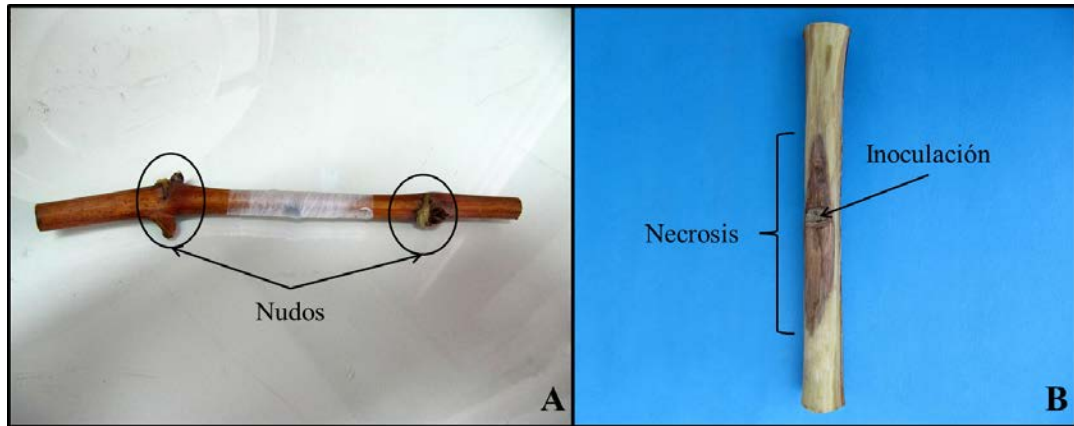


Figura 2. (A) Observación de los nudos de un sarmiento. (B) Observación de la necrosis y punto de inoculación en un sarmiento.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un ANDEVA. En aquellos resultados donde el Andeva arrojó diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,001$).

El ensayo de los cultivares viníferos se analizó en forma independiente con el ensayo de los cultivares de mesa. En cada ensayo (cultivares viníferos y de mesa) se analizaron primero todos los tratamientos, los sarmientos inoculados junto a los controles y posteriormente para ver la susceptibilidad se analizaron solo los cultivares inoculados con el patógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al extraer la corteza en la zona de inoculación, se observó la presencia de necrosis a lo largo de los sarmientos desde la zona inoculada con el patógeno, tanto en los cultivares viníferos como en los de mesa (Figura 3A y 3B). En los sarmientos control la necrosis fue incipiente y correspondió a oxidación del tejido e incluso en algunos no se observó lesión (Figura 4). Luego de hacer todas las mediciones se procedió a realizar un corte transversal, pudiéndose observar la presencia de necrosis en forma de V en ambos tipos de cultivares, lo que corresponde al típico síntoma producido por hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Figura 3C).

Con el fin de asegurarse de la presencia de *D. mutila* en las lesiones necróticas, en ellas se aisló al patógeno, no así en los tratamientos control. Lo anterior estaría demostrando que estas lesiones se deberían a los síntomas causados por el patógeno. En el caso de las lesiones en el control, ellas corresponderían sólo a oxidación de los tejidos como consecuencia de la herida producida.

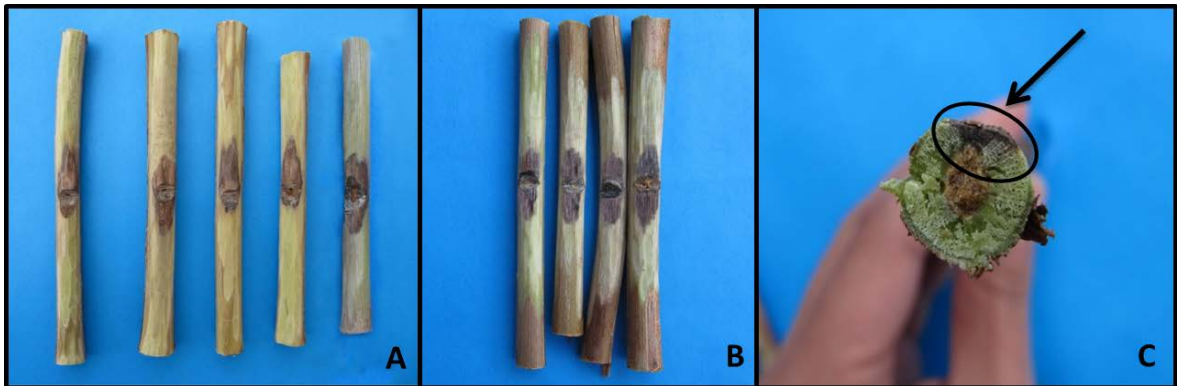


Figura 3. Avance de la lesión a lo largo de los sarmientos en los cultivares; (A) viníferos, (B) de mesa. (C) Corte transversal donde se observa necrosis en forma de V.

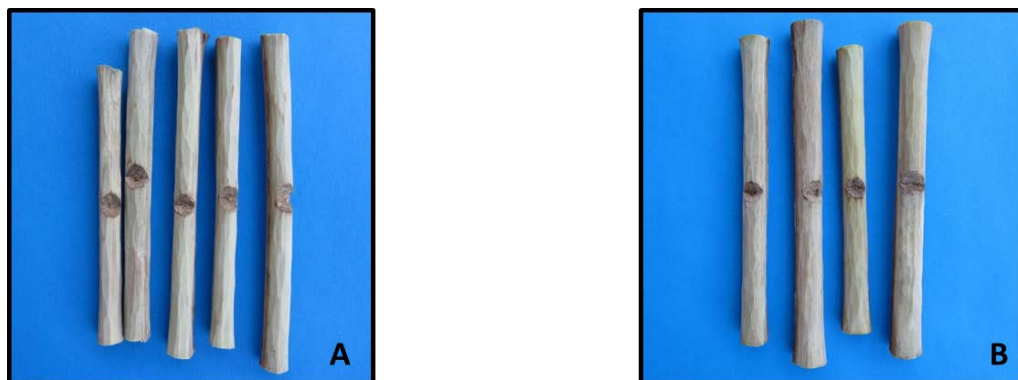


Figura 4. Sarmientos control; (A) viníferos, (B) de mesa.

Cultivares Viníferos

Los datos de los cultivares viníferos inoculados y sus respectivos controles fueron sometidos a un ANDEVA, dando como resultado diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,001$), realizándose posteriormente una comparación múltiple de Tukey (Cuadro 4). Este análisis se realizó con el propósito de observar si existen diferencias entre los tratamientos de los sarmientos inoculados con los controles.

Cuadro 4. Promedios de longitud (cm) de la necrosis en los cultivares viníferos inoculados y controles.

| Tratamientos | Longitud necrosis (cm) |
|---------------------|-------------------------------|
| <u>Inoculados</u> | |
| Syrah | 2,65 a* |
| Malbec | 2,55 a |
| Sauvignon Blanc | 2,51 a |
| Cabernet Franc | 2,47 a |
| Merlot | 2,41 a |
| <u>Controles</u> | |
| Merlot | 0,30 b |
| Sauvignon Blanc | 0,28 b |
| Malbec | 0,28 b |
| Syrah | 0,26 b |
| Cabernet Franc | 0,22 b |

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según comparación múltiple de Tukey ($P < 0,001$).

Se determinó que existen diferencias estadísticas entre los sarmientos control y los inoculados, lo cual significa que el hongo produjo la enfermedad y todos los cultivares fueron susceptibles a *D. mutils*, determinándose por lo tanto que fue patogénico. Estos resultados se respaldan con los estudios realizados por Baskarathevan (2011) en el cultivar Sauvignon Blanc inoculado con *D. mutils*, donde observó que la mayoría de las cepas evaluadas provocaron la enfermedad. En otro estudio en el cultivar Sauvignon Blanc, se obtuvieron resultados similares con respecto a *D. mutils*, donde todas las cepas evaluadas fueron patogénicas (Billones-Baaijens, 2011).

Posterior al análisis de los resultados antes comentados, para ver la susceptibilidad entre los cultivares, se realizó un nuevo análisis de varianza pero solo con los inoculados, obteniéndose diferencias estadísticas no significativas ($P = 0,249$), siendo por consiguiente todos los cultivares igualmente susceptibles entre sí.

Los resultados obtenidos en esta memoria respecto a los cultivares viníferos inoculados, concuerdan con el trabajo de van Niekerk *et al.*, (2004), quienes realizaron pruebas en sarmientos de los cultivares Chardonnay y Cabernet Sauvignon. Ellos, además de utilizar la especie *D. munita* (*B. stevensii*), utilizaron otras de la familia Botryosphaeriaceae, no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los cultivares inoculados con la misma cepa. En otro trabajo realizado por Amponsah (2010a), quien utilizó brotes verdes de los cultivares; Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Pinot Noir, Riesling, y Sauvignon Blanc, los cuales fueron inoculados con cepas de *D. munita*, también arrojaron resultados que todos estos cultivares eran susceptibles. Este mismo autor realizó otro ensayo, utilizando los mismos cultivares y cepas anteriormente evaluadas, pero en esta ocasión trabajó con plantas en macetas, que fueron inoculadas tanto con micelio como con conidias, y mantenidas durante 4 y 7 meses. Los resultados obtenidos de las inoculaciones con micelio y conidias, tanto para 4 y 7 meses de incubación, arrojaron igualdad de susceptibilidad.

Lo anterior podría significar que los cultivares evaluados en este trabajo: Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Sauvignon Blanc y Syrah, se comportarían igual que Pinot Noir, Riesling, Chardonnay y Cabernet Sauvignon, no existiendo diferencias de susceptibilidad a *D. munita* entre ellos.

Al analizar los resultados obtenidos en esta memoria con la de los investigadores que han trabajado con *D. munita* (van Niekerk *et al.*, 2004; Amponsah 2010a; Baskarathevan 2011; Billones-Baaijens 2011), se adiciona un nuevo aporte en relación a la susceptibilidad de los cultivares; Cabernet Franc, Malbec, Merlot y Syrah siendo estos al igual que los demás cvs. evaluados susceptibles a este patógeno.

Cultivares de Mesa

Se procedió a evaluar los datos al igual que en los cultivares viníferos, los inoculados con los controles, dando como resultados diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$), procediéndose luego a una comparación múltiple de Tukey (Cuadro 5). Al igual que en los cultivares viníferos, se realizó este análisis para observar si existen diferencias entre los sarmientos control con los inoculados.

Se determinó que en los sarmientos inoculados con el hongo, este produce una lesión, a diferencia de los controles donde no existió. Lo anterior está demostrando la patogenicidad del hongo, siendo todos los cultivares susceptibles. Los resultados obtenidos en esta memoria son concordantes para el cv. Red Globe en un trabajo realizado por Taylor *et al.*, (2005), los cuales observaron que la cepa de *D. munita* fue patogénica. No obstante lo anterior en una investigación llevada a cabo por Úrbez-Torres y Gubler (2009) demostraron, lo contrario que Taylor *et al.*, (2005), donde 2 de 3 cepas evaluadas fueron no patogénicas en el cv. Red Globe. Lo anterior significaría que existen diferencias de patogenicidad entre cepas del patógeno.

Cuadro 5. Promedios de longitud (cm) de la necrosis en los cultivares de mesa inoculados y controles.

| Tratamientos | Longitud necrosis (cm) |
|---------------------|-------------------------------|
| <u>Inoculados</u> | |
| Thompson Seedless | 2,22 a* |
| Flame Seedless | 2,21 a |
| Crimson Seedless | 2,20 a |
| Red Globe | 2,14 a |
| <u>Controles</u> | |
| Thompson Seedless | 0,29 b |
| Flame Seedless | 0,26 b |
| Red Globe | 0,25 b |
| Crimson Seedless | 0,24 b |

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según comparación múltiple de Tukey (P<0,001).

Posterior al análisis de los resultados antes comentados para ver la susceptibilidad entre los cultivares, se realizó un nuevo análisis de varianza, pero solo con los sarmientos inoculados, donde se determinaron diferencias estadísticas no significativas (P= 0,406), por ende todos los cultivares fueron igualmente susceptibles entre ellos a *D. mutila*.

Al comparar los resultados de este trabajo con otros obtenidos en Chile por Morales *et al.*, (2010b y 2012) con *D. mutila* en sarmientos de los cultivares Red Globe, Flame Seedless y Thompson Seedless, llegaron a la misma conclusión, siendo todos los cultivares evaluados igualmente susceptibles.

Al analizar los resultados obtenidos en esta memoria con la de los investigadores que han trabajado con *D. mutila* (Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres y Gubler 2009; Morales *et al.*, 2010b y 2012), se adiciona un nuevo aporte de susceptibilidad para el cv. Crimson Seedless siendo este al igual que los demás cvs. evaluados susceptible a este patógeno.

Cultivares Viníferos y de Mesa

No obstante de que los tiempos de incubación utilizados en esta investigación fueron diferentes para los cultivares viníferos (4 semanas) y de mesa (6 semanas), ambos cultivares fueron incubados en las mismas condiciones de temperatura y humedad (Véase Apéndice I), por consiguiente, se procedió a realizar un análisis visual entre ellos. Se observó que ambos cultivares tenían similar tamaño de las lesiones; por lo que si esta observación se hubiera realizado a igual tiempo de incubación, posiblemente las lesiones en

los cultivares viníferos serían de mayor tamaño, lo cual podría significar que los sarmientos de los cultivares de uva vinífera evaluados, podrían ser más susceptibles que los sarmientos de los cvs. de uva de mesa evaluados en esta investigación. Esta hipótesis sería respaldada en cierta medida con el trabajo realizado por Úrbez-Torres *et al.*, (2008) quienes realizaron inoculaciones en los cultivares Chardonnay y Thompson Seedless con las cepas de *Lasiodyplodia theobromae* y *D. seriata*, utilizando brotes verdes y plantas en macetas. Las plantas en macetas del cultivar vinífero Chardonnay fueron más susceptibles al ataque de *L. theobromae* que Thompson Seedless. Sin embargo, en los brotes verdes esta respuesta se invierte, siendo el cultivar de mesa Thompson Seedless el más susceptible. Para la cepa *D. seriata* no determinaron diferencias significativas en los ensayos.

Otras consideraciones

Sería relevante consolidar los resultados obtenidos en este trabajo en plantas establecidas, ya sea en macetas o en el campo. Con esto se llevaría al patógeno a condiciones más reales de desarrollo. También se podrían utilizar más cepas de *D. mutila* y así concluir si todas las cepas son igualmente patógenas en diferentes cultivares.

La información obtenida en esta investigación que considera un número mayor de cultivares evaluados que en otros trabajos, indica que no hay una mayor diferenciación entre los cultivares utilizados y una eventual resistencia de estos a *D. mutila*. Por ello, los antecedentes de susceptibilidad obtenidos en esta memoria son relevantes para Chile desde el punto de vista del manejo de la enfermedad, ya que si existe presencia de inóculo a nivel de campo y condiciones favorables, todos los cultivares son susceptibles a enfermarse con *D. mutila*. Lo anterior es más relevante aún, acorde con los resultados de Morales *et al.*, (2010b), quienes sostienen que la especie *D. mutila* posee una mayor virulencia en comparación con otras. Por lo tanto, ello implica considerar prácticas de control adecuadas de la enfermedad, para evitar probables infecciones, sobre todo en la época de poda.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir lo siguiente:

- Todos los cultivares de uva vinífera evaluados; Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Sauvignon Blanc y Syrah, fueron igualmente susceptibles a *Diplodia mutila*.

- Todos los cultivares de uva de mesa evaluados; Crimson Seedless, Flame Seedless, Red Globe y Thompson Seedless fueron igualmente susceptibles a *Diplodia mutila*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Loayza, P.; J. White; M. Bergen and C. Cadenas. 2007. *Diplodia mutila* new reported causing seedling mortality of *Iriartea deltoidea* palm trees. [En línea]. *New Disease Reports*, 15(50). Recuperada en: <<http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=015050>> Consultado el: 12 de abril de 2011.
- Alves, A.; A. Correia; J. Luque and A. Phillips. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96(3): 598–613.
- Amponsah, N. 2010a. Epidemiology of botryosphaeriaceous species associated with grapevines in New Zealand. Degree of Doctor of Philosophy. Christchurch, New Zealand: Lincoln University. 251h.
- Amponsah, N.; E. Jones; H. Ridgway and M. Jaspers. 2010b. Dispersal of Botryosphaeriaceae species conidia from infected grapevines in rain water. P 20. In: Auger, J. y Esterio, M.. Santa Cruz, Chile, 17–21 Enero 2010.
- Auger, J.; M. Esterio; G. Ricke and I. Pérez. 2004. Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease*, 88(11): 1286.
- Auger, J.; M. Esterio; I. Pérez; G. Ricke y C. Ramos. 2005. El síndrome de la declinación y brazo muerto de la Red Globe en Chile. *Aconex*, 89: 30-36.
- Auger, J., Pérez, I. and Esterio, M. 2012. Kiwifruit trees an alternative host and potential source of inoculum of grapevine trunk disease pathogens in Chile. P 126. In: Armengol, J. 8th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Valencia, España, 18–21 Junio 2012.
- Baskarathevan, J. 2011. Botryosphaeriaceous infection in New Zealand vineyards: Identification, population structure and genetic diversity. Degree of Doctor of Philosophy. Christchurch, New Zealand: Lincoln University. 226h.
- Bertsch, C.; M. Ramírez-Suero; M. Magnin-Robert; P. Larignon; J. Chong; E. Abou-Mansour. *et al.* 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62: 243–265.
- Billones-Baaijens, R. 2011. Botryosphaeria infections in New Zealand grapevine nurseries: Sources of inoculum and infection pathways. Degree of Doctor of Philosophy. Christchurch, New Zealand: Lincoln University. 264h.

Billones- Baaijens, R., Jones, E., Ridgway, H. and Jaspers, M. 2010. Botryosphaeriaceae infection in New Zealand grapevine nursery plant materials. P 46. *In*: Auger, J. y Esterio, M. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, Chile, 17–21 Enero 2010.

Chiarappa, L. 2000. Esca (black measles) of grapevine. An overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 11–15.

Cobos, R. 2008. Los Decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctor. Salamanca, España: Universidad de Salamanca. 166p.

De Almeida, A. 2008. Doenças causadas por fungos Botryosphaeriaceae em videira: caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas. Tese Mestre em Engenharia agrónomica. Lisboa, Portugal: Universidade Técnica de Lisboa. 79p.

Di Marco, S.; A. Mazzullo; F. Calzarano and A. Cesari. 2000. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 232-240.

Denman, S.; P. Crous; J. Taylor; J. Kang; I. Pascoe and M. Wingfield. 2000. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45: 129-140.

Giménez-Jaime, A.; A. Aroca; R. Raposo; J. García-Jiménez and J. Armengol. 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154: 598–602.

Gramaje, D. and J. Armengol. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95(9): 1040–1055.

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

Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. 2008. [En línea]. Estados Unidos: Farr, D.; A. Rossman; M. Palm and E. McCray. Recuperado en: <<http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>> Consultado el: 10 de abril de 2011.

Larignon, P. et B. Dubos. 2001a. Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma – La Defense des Vegetaux*, 538: 26-29.

Larignon, P. and B. Dubos. 2001b. The villainy of black dead arm. *Wines Vines*, 82: 86-89.

- Larignon, P.; R. Fulchic et B. Dubos. 2001c. Un nouveau dépérissement de la vigne en France: le Black Dead Arm causé par *Botryosphaeria* spp. *IOBC/WPRS Bulletin*, 24(7): 51-55.
- Larignon, P.; R. Fulchic; L. Cere and B. Dubos. 2001d. Observations on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 336–342.
- Lecomte, P.; M. Leyo; G. Louvet; M. Corio-Coset; J. P. Gaudillere et D. Blancard. 2005. Le black dead arm, genese des symptomes. *Phytoma – La Defense des Vegetaux*, 587: 29-37.
- Luque, J.; J. Parladé y J. Pera. 2001. El decaimiento del alcornoque en Cataluña: síntomas y hongos asociados. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, 10(2): 271-289.
- Martos, S. 2008. El decaimiento de la vid: enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia botryosphaeriaceae. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Barcelona, España: Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. 225p.
- Montagne, JFC. 1834. Notice sur les Plantes Cryptogames récemment découvertes en France, contenant aussi l'indication précise des localités de quelques espèces les plus rares de la Flore française. *Annales des Sciences Naturelles, sér.*, 2(1): 295–307.
- Morales, A., Besoain, X. and Latorre, B. 2010a. Identification of Botryosphaeriaceae spp. associated with *Vitis vinifera* arm dieback. P 35. In: Auger, J. y Esterio, M. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, Chile, 17–21 Enero 2010.
- Morales, A., Besoain, X. and Latorre, B. 2010b. Pathogenicity and virulence of Botryosphaeriaceae associated with arm dieback of *Vitis vinifera* in Chile. P 68. In: Auger, J. y Esterio, M. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, Chile, 17–21 Enero 2010.
- Morales, A.; E. Piontelli; B. Latorre and X. Besoain. 2012. Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(3): 445-458.
- Moret, A. y M. Nadal. 1991. Distribución de *Diplodia mutila* Fr. Apud Mont. en Catalunya. *Acta Botánica Malacitana*, 16(1): 93-96.
- ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), Chile. 2014a. Boletín frutícola: Avance junio 2014. 2014. Santiago, Chile: ODEPA. 29p. (Publicaciones: Boletines).
- ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), Chile. 2014b. Boletín de vinos y pisco, producción, precios y comercio exterior: Avance a junio 2014. 2014. Santiago, Chile: ODEPA. 22p. (Publicaciones: Boletines).

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias), Chile. 2014c. Comercio exterior silvoagropecuario: primer trimestre 2014. 2014. Santiago, Chile: ODEPA. 22p. (Publicaciones: Artículos).

Phillips, A. 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146: 327-332.

Phillips, A. 2002. Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41(1): 3-18.

Phillips, A. 2007. The Botryosphaeria site. Disponible en: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/botryosphaeria_stevensii_2.htm. Leído el 2 de abril de 2014.

Phillips, A.; A. Alves; S. Pennycook; P. Johnston; A. Ramaley; A. Akulov. *et. al.* 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia*, 21: 29-55.

Pitt, W., Huang, R., Steel, C., Whitelaw-Weckert, M. and Savocchia, S. 2010. Identification and distribution of the Botryosphaeriaceae associated with grapevine decline in south-eastern Australia. P 36. *In:* Auger, J. y Esterio, M. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, Chile, 17–21 Enero 2010.

Pusey, P. 1989. Availability and dispersal of ascospores and conidia of *Botryosphaeria* in peach orchards. *Phytopathology*, 79(6): 635–639.

Rolshausen, P. and W. Gubler. 2005. Use of boron for the control of eutypa dieback of grapevines. *Plant Disease*, 89: 734–738.

Rolshausen, P.; J. Urbez-Torrez; S. Rooney-Latham; A. Eskalen; R. Smith and W. Gubler. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 113–9.

Sánchez, M.; J. Venegas; M. Romero; A. Phillips y A. Trapero. 2003. El chancro de encinas y alcornoques causado por *Botryosphaeria* spp. en Andalucía. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*, 29: 593-612.

Sánchez-Torres, P.; R. Hinarejos; V. González and J. Tuset. 2008. Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(4): 650-660.

Savocchia, S.; C. Steel; B. Stodart and A. Somers. 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46(1): 27-32.

Shoemaker, R. 1964. Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany*, 42: 1297–1301.

Sidoti, A. and G. Granata. 2004. Manna ash (*Fraxinus ornus*): a new host of *Diplodia mutila*. *Informatore Fitopatologico*, 54(2): 49-51.

Spagnolo, A.; G. Marchi; F. Peduto; A. Phillips and G. Surico. 2011. 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*, 129: 485-500.

Sutton, T. 1981. Production and dispersal of ascospores and conidia by *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology*, 71(6): 584–589.

Taylor, A.; G. Hardy; P. Wood and T. Burgess. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34(2): 187–195.

Tisserat, N.; A. Rossman and A. Nus. 1988. A canker disease of Rocky Mountain juniper caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Plant Disease*, 72(8): 699-701.

Úrbez-Torres, J.; G. Leavitt; T. Voegel and W. Gubler. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12): 1490-1503.

Úrbez-Torres, J.; G. Leavitt; J. Guerrero; J. Guevara and W. Gubler. 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.

Úrbez-Torres, J. and W. Gubler. 2009. Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93(6): 584-592.

Úrbez-Torres, J. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Botryosphaeriaceae occurring on grapevines (Supl.). In: *Phytopathologia Mediterranea*. 50: 5–45.

Valderrama, J., Herrera, R. y Montealegre, J. 2011. Selección *in vitro* de bioantagonistas para el control de *Diplodia seriata* De Not, *Diplodia mutila* Fr. Mont., *Fusicoccum aesculi* Corda y *Neofusicoccum australe* Slippers. Resúmenes XX Congreso Nacional de Fitopatología. Disponible en: <http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XX.html> Leído el 5 de Enero de 2012.

van Niekerk, J., Crous, P., Fourie, P., Groenewald, E. and Halleen, F. 2002. Botryosphaeria canker and dieback of grapevines. Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers.

Disponible en: <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0902botryo.php3>. Leído el 26 de abril de 2011.

van Niekerk, J.; P. Crous; E. Groenewald; P. Fourie and F. Halleen. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96(4): 781-798.

van Niekerk, J.; P. Fourie; F. Halleen and W. Crous. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 43-54.

Waite, H. 2013. Understanding trunk diseases: how and why they threaten the wine industry. *Wine & Viticulture Journal*, 28(6): 50-54.

Whitelaw-Weckert, M.; V. Sergeeva and M. Priest. 2006. *Botryosphaeria stevensii* infection of Pinot Noir grapevines by soil-root transmission. *Australasian Plant Pathology*, 35: 369-371.

Wunderlich, N., Ash, G., Steel, C., Rahman, H. and Savocchia, S. 2010. Botryosphaeriaceae associated with bunch rot of grapes in South Eastern Australia. P 17. In: Auger, J. y Esterio, M. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Santa Cruz, Chile, 17-21 Enero 2010.

APÉNDICES

Apéndice I. Temperaturas y humedades relativas registradas durante el tiempo de incubación (28 días para los cultivares viníferos y 42 días para los cultivares de mesa).

| Día | Temperatura (°C) | Humedad Relativa (%HR) | Día | Temperatura (°C) | Humedad Relativa (%HR) |
|-----|------------------|------------------------|-----|------------------|------------------------|
| 1 | 25,0 | 91,0 | 22 | 24,5 | 96,0 |
| 2 | 25,0 | 92,0 | 23 | 25,0 | 96,0 |
| 3 | 25,0 | 93,0 | 24 | 25,0 | 96,5 |
| 4 | 25,5 | 93,0 | 25 | 25,0 | 96,5 |
| 5 | 25,0 | 93,5 | 26 | 24,5 | 96,5 |
| 6 | 25,0 | 94,0 | 27 | 25,0 | 96,5 |
| 7 | 25,0 | 94,0 | 28 | 25,0 | 96,5 |
| 8 | 25,0 | 94,5 | 29 | 25,0 | 96,5 |
| 9 | 25,0 | 94,5 | 30 | 24,5 | 96,5 |
| 10 | 25,0 | 95,0 | 31 | 25,0 | 95,0 |
| 11 | 25,0 | 95,0 | 32 | 25,0 | 95,0 |
| 12 | 25,0 | 95,0 | 33 | 25,0 | 95,0 |
| 13 | 25,0 | 95,0 | 34 | 25,0 | 94,0 |
| 14 | 24,5 | 95,5 | 35 | 25,0 | 94,5 |
| 15 | 25,0 | 95,5 | 36 | 25,0 | 95,0 |
| 16 | 25,0 | 95,5 | 37 | 25,0 | 94,0 |
| 17 | 24,5 | 95,5 | 38 | 25,0 | 94,0 |
| 18 | 24,5 | 95,5 | 39 | 25,0 | 93,5 |
| 19 | 25,0 | 95,5 | 40 | 24,5 | 95,5 |
| 20 | 25,0 | 95,5 | 41 | 24,5 | 95,5 |
| 21 | 25,0 | 96,0 | 42 | 24,5 | 95,5 |

ANEXOS

Anexo I: Características morfológicas de *Botryosphaeria stevensii* y su anamorfo *Diplodia mutila*. (Fuente: Phillips, A. 2007. The Botryosphaeria site. Disponible en: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/botryosphaeria_stevensii_2.htm).

B. stevensii

Ascosporas: (25–) 28–35 (–36) × (9,5–) 10–12,5 (–13,5) μm, hialina, aseptada, ocasionalmente convertirse en marrón y 1 a 2 septas con la edad.

Peritecio de color marrón oscuro, inmerso, unilocular, paredes gruesas de color marrón oscuro. Ascus claviformes y estipitados.



Figura 4: Peritecios



Figura 5: Ascus

Figura 6: Ascosporas
(Escala de la barra: 10 μm)

D. mutila

Picnidios separados o agregados, globosos, de color marrón oscuro a negro, inmersos, unilocular, de paredes gruesas; capas de la pared exterior de pared gruesa, capas interiores de pared delgada, hialina; ostiolo central papilado.



Figura 7: Picnidios

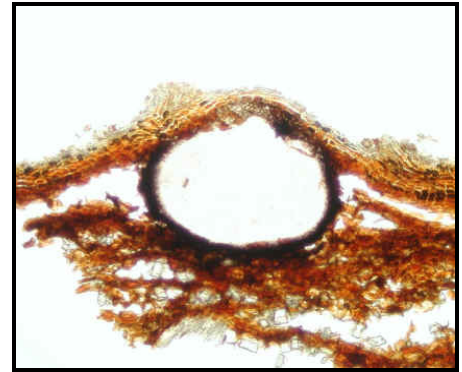


Figura 8: Sección Picnidio



Figura 9: Conidias
(Escala de la barra: 10 μ m)