

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

*ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS*



**Estudio de la presencia en suelo de campos de  
viveros de vid de hongos que causan el pie  
negro y la enfermedad de Petri mediante el uso  
de plantas trampa**

**TESIS DE MASTER**

Autor:

**Pablo López Soriano**

Director académico:

**Dr. Josep Armengol Fortí**

**Valencia, Noviembre de 2010**

## **Autorización del director/a, codirector/ o tutor/a**

---

A cumplimentar por el director/a, codirector/ o tutor/a

Nombre y apellidos: Dr. Josep Armengol Fortí

Departamento: Ecosistemas agroforestales

En calidad de: Director

Autorizo la presentación de la Tesina de máster “Estudio de la presencia en suelo de campos de viveros de vid de hongos que causan el pie negro y la enfermedad de Petri mediante el uso de plantas trampa” y certifico que se adecua plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido exigidos en la normativa existente.

(Firma) Director Tesina de máster

Valencia, a 10 de Noviembre de 2010

## RESUMEN

El pie negro de la vid causado por hongos del género *Cylindrocarpon* y la enfermedad de Petri causada por los hongos *Phaeoconiella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea* y varias especies del género *Phaeoacremonium*, son los responsables del decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes de vid. Este es uno de los problemas más graves que afectan a este cultivo en las principales regiones productoras en todo el mundo. Con este trabajo se pretende comprobar la posible presencia de estos patógenos en el suelo de campos de viveros de vid y su capacidad para infectar plantas sanas mediante el uso de plantas trampa. Para ello, plantas de los cultivares Bobal y Palomino, y del patrón 41-B, procedentes de semilla, se plantaron durante el mes de julio de 2009 en dos parcelas, un campo de plantas madre de patrones y un campo de enraizamiento. Durante los meses de marzo y abril de 2010, cuando las plantas alcanzaron los 8 meses de edad, se arrancaron y procesaron. Las raíces de las plantas mostraron síntomas característicos del pie negro, como la reducción de barbada y lesiones necróticas. Colonias de *Cylindrocarpon* spp. se aislaron con elevada frecuencia a partir del sistema radicular siendo la especie *Cylindrocarpon macrodidymum* la única de este género que se encontró. Respecto a los hongos responsables de la enfermedad de Petri, a partir de los tejidos xilemáticos de las plantas se obtuvieron en baja proporción aislados de *Cadophora luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Pm. parasiticum*. Los resultados confirman la presencia en el suelo de campos de viveros de vid de hongos patógenos responsables del pie negro de la vid y de la enfermedad de Petri, y que éstos son capaces de infectar plantas sanas.

Palabras clave: *Cylindrocarpon macrodidymum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *phaeoacremonium parasiticum*, *Vitis vinifera*.

## ABSTRACT

### **Detection of fungal pathogens associated with black foot and Petri diseases in the soil of grapevine nurseries using plant baits.**

Black foot disease, caused by *Cylindrocarpon* spp. and Petri disease, caused by *Phaeoconiella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea* and several species of *Phaeoacremonium*, are responsible for the decline and dieback of young grapevines. This is one of the most serious problems affecting this crop in the main producing regions worldwide. This work investigates the possible presence of these pathogens in the soil of grapevine nurseries and their ability to infect healthy plants, using plant baits. Seedlings of cvs. Bobal and Palomino, and rootstock 41-B were planted during July 2009 in two different fields: a grapevine rootstock mother field and an openroot field. Eight months after plantation, plants were carefully dug out from the soil and taken back to the laboratory for immediate processing. Roots showed characteristic symptoms of black foot disease, such as root mass reduction and necrotic lesions. Colonies of *Cylindrocarpon* spp. were isolated with high frequency from roots and the only species detected was *C. macrodidymum*. Fungal pathogens associated with Petri disease were isolated from xylem tissues and colonies of *C. luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Pm. parasiticum* were detected at low frequency. These results confirm the presence of fungal pathogens responsible for black foot disease and Petri disease in the soil of grapevine nurseries and their ability to infect healthy plants.

Key words: *Cylindrocarpon macrodidymum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *phaeoacremonium parasiticum*, *Vitis vinifera*.

# ÍNDICE

<b>I.- Introducción</b> .....	1
<b>II.- Material y métodos</b> .....	6
II.1.- Material vegetal.....	6
II.2.- Plantación en campo y diseño experimental.....	6
II.3.- Procesado de muestras y aislamiento de hongos.....	7
II.4.- Identificación fúngica.....	8
II.4.1.- Identificación de <i>Cylindrocarpon</i> spp.....	8
II.4.2.- Identificación de hongos asociados a la enfermedad de Petri.....	9
<b>III.- Resultados</b> .....	10
III.1.- Aislamiento e identificación de <i>Cylindrocarpon</i> spp.....	10
III.2.- Aislamiento e identificación de hongos asociados a la enfermedad de Petri.....	13
<b>IV.- Discusión</b> .....	14
<b>V.- Bibliografía</b> .....	18

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Número y variedad de plantas de vid recogidas en cada línea en cada parcela de estudio.....8

**Tabla 2.** Plantas infectadas (%) y puntos de aislamiento positivo (%) para *Cylindrocarpon macrodidymum* en plantas de vid de los cultivares Bobal y Palomino, y patrón 41-B en la parcela de Aiello de Malferit.....12

**Tabla 3.** Plantas infectadas (%) y puntos de aislamiento positivo (%) para *Cylindrocarpon macrodidymum* en plantas de vid de los cultivares Bobal y Palomino, y patrón 41-B en la parcela de Rotglà i Corberà.....12

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** **A:** campo de plantas madre de patrones de vid situado en la localidad de Aiello de Malferit, donde se observan cuatro filas de plantas protegidas por tubos de plástico. **B:** campo de enraizamiento de plantas de vid situado en la localidad de Rotglà i Corberà, donde se observan cuatro filas de plantas en el momento de colocar los tubos protectores. En la primera fila se pueden apreciar las plantas en estado de 2-3 hojas verdaderas.....7

**Figura 2.** Aspecto de las raíces de plantas de vid del cultivar Palomino. A: planta control cultivada en invernadero con abundante barbada. B: tres plantas procedentes de la parcela de Aiello de Malferit cuyas raíces muestran distintos grados de reducción del sistema radical y lesiones necróticas.....10

**Figura 3.** Identificación de aislados de *Cylindrocarpon macrodidymum* obtenidos de raíces de plantas trampa de vid mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando tres pares de cebadores específicos, Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2, y Pau1/MaPa2. Líneas 1 a 18: aislados positivos del cultivar Bobal en Aiello de Malferit (Líneas 1, 6, 7 y 9), patrón 41-B en Aiello de Malferit (Líneas 2, 3, 4 y 5), Palomino en Rotglà i Corberà (Líneas 8, 12, 13, 14, 15, 16 y 17), Bobal en Rotglà i Corberà (Línea 18), y patrón 41-B en Rotglà i Corberà (Líneas 10 y 11); líneas 19 a 21, control positivo (DNA de cultivo puro) de *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* y *C. pauciseptatum*, respectivamente; línea 22, control negativo; líneas M, marcador de DNA de 100-pb...11

## I.- INTRODUCCIÓN

Desde hace poco más de una década se viene observando en los viñedos de las diferentes regiones productoras de vid en el mundo, incluida España, un incremento en los problemas de decaimiento y muerte progresiva de plantas, principalmente jóvenes (Alaniz *et al.*, 2009b). Este fenómeno se atribuye mayoritariamente a hongos de madera de la vid, considerados como uno de los grupos de patógenos más agresivos para este cultivo (Oliveira *et al.*, 2004). Dentro de este grupo destacan principalmente *Phaeoconiella chlamydospora* Crous & W. Gams y especies del género *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf, responsables de la enfermedad de Petri, y *Cylindrocarpon* spp., agente causal del pie negro de la vid (Oliveira *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que *Cadophora luteo-olivacea* aparece también con frecuencia en plantas de vid afectadas por la enfermedad de Petri en diferentes regiones vitícolas del mundo (Gramaje *et al.*, 2010).

La enfermedad de Petri causa una reducción del crecimiento y un decaimiento general de las plantas de vid. Esta enfermedad afecta principalmente a las plantas jóvenes causando enormes pérdidas en nuevas plantaciones (Mostert *et al.*, 2006). La enfermedad de Petri está causada por *Pa. chlamydospora* y varias especies del género *Phaeoacremonium*. Hasta la fecha, se han descrito 34 especies de este género, 25 de las cuales han sido aisladas en vid, siendo *Pm. aleophilum* la más común y ampliamente distribuida por todas las regiones vitícolas del mundo (Mostert *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2009; Graham *et al.*, 2009). *Pa. chlamydospora* está considerado como el principal patógeno asociado a la enfermedad de Petri debido a su predominancia en las plantas afectadas (Ridgway *et al.*, 2005) y a su mayor virulencia (Retief *et al.*, 2006).

Los síntomas externos que muestran las plantas afectadas por la enfermedad de Petri incluyen reducción del desarrollo, acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas con clorosis internervial, tallos y ramas más pequeños y un decaimiento general que acaba con la muerte de la planta (Retief *et al.*, 2006). Los síntomas internos son fácilmente apreciables en el tronco y en los brazos. Si cortamos el tronco transversalmente se observan manchas negras y necróticas en el xilema (Oliveira *et al.*, 2004) y si lo cortamos longitudinalmente esa decoloración marrón oscura-negra se extiende a lo largo



de los vasos del xilema (Mostert *et al.*, 2006), junto a la formación de tilosas (Retief *et al.*, 2006). Es frecuente observar exudados de savia de color negro procedentes de los vasos del xilema cuando cortamos un brazo afectado (Mostert *et al.*, 2006). Aunque la enfermedad de Petri puede causar un colapso rápido y muerte de plantas jóvenes, lo normal es que el decaimiento sea lento y progresivo, produciéndose el amarilleamiento de las hojas, la muerte de alguna rama y la reducción del crecimiento a partir del primer año después de la plantación (Ridgway *et al.*, 2005).

El pie negro de la vid es una enfermedad grave que afecta principalmente a plantas de vivero y a plantaciones jóvenes. Fue descrita por primera vez en 1961 en Francia, pero es a partir de los años noventa cuando esta enfermedad comienza a ser considerada de interés. Los agentes causales de esta enfermedad son *Cylindrocarpon* spp. y *Campylocarpon* spp. (Halleen *et al.*, 2006). Dentro del género *Cylindrocarpon* se conocen principalmente dos especies: *C. liriodendri* J.D. MacDonald & E.E. Butler y *C. macrodidymum* Schroers, Hallen & Crous (Alaniz *et al.*, 2009b). La presencia de ambas especies ha sido confirmada en Australia, España, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Uruguay. En otros países como Alemania, Argentina, Brasil, Francia, Irán o Portugal, hasta ahora solo se ha descrito la presencia de *C. liriodendri*, mientras que en Canadá y Chile sólo *C. macrodidymum* (Abreo *et al.*, 2010; Alaniz *et al.*, 2009b). Schroers *et al.* (2008) describieron una tercera especie asociada a la viña, *C. pauciseptatum* Schroers & Crous, aislada en viñas procedentes de Eslovenia y Nueva Zelanda. Recientemente, De Francisco *et al.* (2009) y Abreo *et al.* (2010) han descrito esta especie por primera vez en España y Uruguay, lo que sugiere una mayor distribución de *C. pauciseptatum* de la que hay actualmente registrada.

Durante la primavera, las plantas de vid infectadas por *Cylindrocarpon* spp. presentan un retraso en su desarrollo, con una vegetación débil, hojas cloróticas y achaparradas y entrenudos más cortos. En ocasiones, algunas yemas o la planta entera no llegan ni a brotar. En la parte aérea, estos síntomas son consecuencia de los daños sufridos en las raíces y el cuello de la planta, donde ocurre la infección. Cuando se arrancan las plantas se detecta una importante reducción de la barbada. Al mirar detalladamente las raíces, se observan lesiones oscuras, necróticas y deprimidas (Halleen *et al.*, 2006; Alaniz *et al.*, 2009b). En ocasiones, para compensar esa pérdida de masa radicular, algunas plantas desarrollan una nueva emisión de raíces,

normalmente por encima de la zona afectada, quedando éstas más cercanas a la superficie del suelo (Alaniz *et al.*, 2009b). Estas nuevas raíces formadas en la zona de la corona basal se vuelven necróticas rápidamente (Halleen *et al.*, 2006). En la madera del portainjerto pueden observarse coloraciones oscuras y necrosis generalizadas que se inician desde la base del mismo y se extienden hacia arriba. En cortes transversales, estas lesiones necróticas pueden ir desde la corteza hasta la médula (Alaniz *et al.*, 2009b). Todos estos síntomas pueden conducir a la muerte de la planta en la misma campaña o en las siguientes, en función de la edad de la planta. Las más jóvenes mueren rápidamente, mientras que, a medida que tienen más años, el decaimiento es más gradual (Gubler *et al.*, 2004).

Las principales fuentes de inóculo de estos hongos incluyen material de propagación infectado, el suelo y, en el caso de los hongos que causan la enfermedad de Petri, la transmisión aérea, ya que se ha demostrado que las esporas tanto de *Pa. chlamydospora* como de *Phaeoacremonium* spp., son capaces de diseminarse por el aire y penetrar en las plantas a través de heridas de poda (Mostert *et al.*, 2006; Retief *et al.*, 2006).

En cuanto al material de propagación, se ha demostrado que éste puede ser infectado tanto antes como después de su paso por los viveros, indicando esto, que las infecciones se pueden producir debido a la utilización de plantas madres de patrones infectadas o durante las operaciones realizadas en los viveros (Mostert *et al.*, 2006). Las plantas madre de patrones son una importante fuente de inóculo de los patógenos responsables de la enfermedad de Petri en España (Aroca *et al.*, 2010). Ridgway *et al.* (2003) también detectaron la presencia de *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. en plantas madre de patrones en Nueva Zelanda. Además, la presencia de estos patógenos en las plantas madre de patrones no está relacionada con la observación de síntomas externos, por lo que se aumentan todavía más los riesgos de propagación (Aroca *et al.*, 2010). Asimismo, la infección del material vegetal también se puede producir durante las diferentes operaciones llevadas a cabo en los viveros durante el proceso de propagación (Mostert *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2010). Se ha detectado la presencia de *Pa. chlamydospora* en balsas de hidratación de las varetas y en las herramientas de trabajo en viveros de Nueva Zelanda (Whiteman *et al.*, 2003) y de Sudáfrica (Retief *et al.*, 2006). En España, Aroca *et al.* (2010) detectaron estos

patógenos en balsas de hidratación, máquinas de injerto, tijeras y en la turba donde se colocan las varetas una vez injertadas para la formación del callo e inducción de la formación de raíces.

Con todo, al tratarse de hongos que habitan comúnmente en el suelo, las plantas también pueden infectarse en el terreno definitivo. *Pa. chlamydospora* se ha encontrado en suelos tanto de viveros como de campos de vid mediante técnicas moleculares (Damm y Fourie, 2005). La formación de clamidosporas permitiría a esta especie sobrevivir en el suelo durante largos periodos. Al parecer, estas clamidosporas forman conidios que son capaces de penetrar en raíces de plantas sanas tanto en viveros como en campo (Retief *et al.*, 2006). Diferentes especies de *Phaeoacremonium* también han sido aisladas a partir de suelos de diferentes países como Argentina (Retief *et al.*, 2006), Tahití (Dupont *et al.*, 2002) y Estados Unidos (Rooney *et al.*, 2001).

En el caso de *Cylindrocarpon*, la producción de clamidosporas les permite sobrevivir largas temporadas en el suelo en ausencia de hospedantes; sin embargo, existe poca información acerca de qué papel juegan exactamente en la supervivencia de este patógeno y en la infección de las plantas (Alaniz *et al.*, 2009b), aunque en el género *Cylindrocladium*, relativamente cercano, se ha observado que sus clamidosporas pueden permanecer viables en el suelo hasta 15 años (Halleen *et al.*, 2006). *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* infectan a las vides a través de heridas en las raíces, pero también pueden penetrar por la base del portainjerto. Cuando las varetas de los patrones son plantadas en el suelo, el callo de la base sufre pequeñas heridas que pueden ser vía de entrada de estos patógenos (Alaniz *et al.*, 2009b).

El decaimiento y muerte progresiva de las plantas de vid ocasionado por los hongos que causan la enfermedad de Petri y por hongos del género *Cylindrocarpon* es uno de los principales problemas actuales en las principales regiones vitícolas del mundo, pero existe muy poca información acerca de la biología y epidemiología de estos hongos, especialmente sobre su presencia en el suelo de campos de vid, y su capacidad para infectar plantas sanas.

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo es estudiar y confirmar la posible presencia de estos hongos patógenos en el suelo de campos de viveros de vid mediante el uso de plantas trampa.

## **II.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **II.1.- Material vegetal**

Las plantas de vid utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de semillas de racimos de plantas de los cultivares Palomino, Bobal y del patrón 41-B. Previamente a la realización del semillero, las semillas se sometieron a una serie de procesos para inducir su germinación. En primer lugar, inmediatamente después de su extracción, las semillas se mantuvieron en remojo en agua oxigenada diluida al 50% durante 24 horas y después se volvieron a remojar en ácido giberélico (1000 ppm) durante otras 24 horas. Pasado este tiempo las semillas se aclararon con agua y posteriormente se mezclaron con arena estéril húmeda autoclavada (aproximadamente un puñado de semillas por uno o dos kilos de arena). Las bolsas que contenían la mezcla de arena y semillas se guardaron durante un mes a una temperatura de 1-2 °C. Finalmente, las semillas se plantaron en bandejas que fueron colocadas en el invernadero a una temperatura de 25 °C.

### **II.2.- Plantación en campo y diseño experimental**

En el momento en que las plantas tenían de dos a tres hojas verdaderas se plantaron en campo. Para ello, se utilizaron dos parcelas de viveros de vid, un campo de plantas madre de patrones situado en la localidad de Aiello de Malferit y un campo de enraizamiento en la localidad de Rotglà i Corberà, situadas ambas en la provincia de Valencia.

La plantación se realizó en el mes de julio del año 2009. En cada una de las parcelas, las plantas se colocaron en cuatro filas de forma aleatoria (Figura 1). Para este estudio se utilizaron sólo las plantas de las dos primeras filas de cada parcela, dejando las otras dos para estudios posteriores. En la parcela de Aiello de Malferit, en la fila 1 se plantaron: 12 plantas de la variedad Palomino, 12 de la variedad Bobal y 12 del patrón 41-B, mientras que en la fila 2 se plantaron: 12 de Palomino, 12 de Bobal y 12 de 41-B. En la parcela de Rotglà i Corberà se plantaron en la fila 1: 12 plantas de Palomino, 8 de Bobal y 5 de 41-B, mientras que en la fila 2 se plantaron: 13 de Palomino, 9 de Bobal y 6 de 41-B. El número irregular de plantas de una y otra variedad en cada parcela fue debido a la disponibilidad del material vegetal, al obtenerse una germinación variable

tanto para el patrón como para los cultivares. Las dos parcelas disponían de un sistema de riego localizado y las plantas se protegieron con tubos de plástico para evitar el ataque de conejos. Durante el periodo de cultivo las plantas se sometieron a las prácticas de cultivo habituales realizadas por los viveros. No se realizó ningún tratamiento con fungicidas.

Además, dos plantas por cultivar y patrón se seleccionaron para utilizarlas como plantas control. Éstas se plantaron en macetas individuales de 16 cm de diámetro rellenas de turba estéril que se colocaron en el invernadero a una temperatura de 25 °C. Las macetas se regaron una vez por semana.



**Figura 1.** **A:** campo de plantas madre de patrones de vid situado en la localidad de Aielo de Malferit, donde se observan cuatro filas de plantas protegidas por tubos de plástico. **B:** campo de enraizamiento de plantas de vid situado en la localidad de Rotglà i Corberà, donde se observan cuatro filas de plantas en el momento de colocar los tubos protectores. En la primera fila se pueden apreciar las plantas en estado de 2-3 hojas verdaderas.

### II.3.- Procesado de muestras y aislamiento de hongos

Durante los meses de marzo y abril de 2010 se arrancaron las plantas de las filas 1 y 2 de ambas parcelas para su posterior procesado. En la Tabla 1 se observa el número de plantas recogidas en cada parcela. No se pudieron recoger todas las plantas que inicialmente se habían plantado debido a la muerte de alguna de ellas durante el ciclo de cultivo. Inmediatamente se procedió a la eliminación de la parte aérea de las plantas, dejando solo 10 cm de la parte basal del tallo y las raíces.

**Tabla 1.** Número y variedad de plantas de vid recogidas en cada línea en cada parcela de estudio.

	Aiolo de Malferit		Rotglà i Corberà	
	Fila 1	Fila 2	Fila 1	Fila 2
<b>Palomino</b>	12	10	12	13
<b>Bobal</b>	11	12	6	9
<b>41-B</b>	12	10	5	5

Las muestras se lavaron con agua para eliminar los restos del suelo, y posteriormente se desinfectaron en un baño de hipoclorito sódico (1,5 % de cloro activo) durante 1 minuto, seguido de dos baños con agua estéril.

Para el aislamiento de los hongos del género *Cylindrocarpon* se seleccionaron fragmentos de tejido necrosado de las raíces y se sembraron en medio PDAS (39 g de patata-dextrosa-agar; 0,5 g de sulfato de estreptomicina; 1 litro de agua destilada), mientras que para el aislamiento de los hongos responsables de la enfermedad de Petri se cortaron pequeños discos de la parte basal del tallo, a los que previamente se les había eliminado la corteza, y se sembraron en medio MEAS (20 g de extracto de malta; 15 g de agar; 0,5 g de sulfato de estreptomicina; 1 litro de agua destilada). Las placas de aislamiento se incubaron en estufa a 25 °C en oscuridad durante 10 días. De las colonias se extrajeron puntas hifales que se repicaron a medio PDA (39 g de patata-dextrosa-agar; 1 litro de agua destilada), para su posterior identificación.

## II.4.- Identificación fúngica

### II.4.1.- Identificación de *Cylindrocarpon* spp.

La identificación morfológica de los aislados de *Cylindrocarpon* spp. se hizo a partir de las características de crecimiento de su micelio en las colonias repicadas en PDA, comprobando bajo el microscopio la presencia de macroconidios, microconidios y la presencia de conidióforos largos característicos del género *Cylindrocarpon*.

La identificación molecular de las especies de *Cylindrocarpon* se llevó a cabo a partir de los cultivos puros en PDA guardados en la oscuridad durante 2-3 semanas a 25 °C, que fueron raspados y triturados a un polvo fino con nitrógeno líquido en un

mortero. El DNA genómico fue extraído utilizando el kit comercial EZNA Plant DNA Miniprep (Omega Bio-tek, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La identificación de las especies de *Cylindrocarpon* se confirmó mediante PCR múltiple usando tres pares de cebadores específicos (Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 y Pau1/MaPa2) (Alaniz *et al.*, 2009a). El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 0,7 % teñido con bromuro de etidio.

#### II.4.2.- Identificación de hongos asociados a la enfermedad de Petri

Los caracteres morfológicos utilizados para distinguir las especies de *Phaeoacremonium* fueron la morfología de los conidióforos, el tipo y forma de las fíalidas, el tamaño de los hinchamientos hifales y la pigmentación y crecimiento de las colonias en PDA (Mostert *et al.*, 2006).

La especie *Cadophora luteo-olivacea* fue identificada mediante la morfología de los conidióforos, el tamaño de fíalidas y conidios y la pigmentación y el crecimiento de las colonias en PDA (Gams, 2000; Harrington y McNew, 2003).

A nivel molecular, las especies de *Phaeoacremonium* fueron identificadas mediante el método de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (Aroca y Raposo, 2007) y fueron confirmadas mediante el análisis de la secuencia del gen de la beta tubulina utilizando los cebadores T1 (O'Donnell y Cigelnik, 1997) y Bt2b (Glass y Donaldson, 1995). Además, estas secuencias se compararon con el sistema de identificación en red para las especies de *Phaeoacremonium* (<http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium/biolomics.aspx>) desarrollado por Mostert *et al.*, (2006).

La identificación molecular de *Ca. luteo-olivacea* se llevó a cabo mediante el análisis de la región ITS del ADN amplificado con los cebadores ITS1F e ITS4 (Gardes y Bruns, 1993).

Los productos de la PCR fueron purificados con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y secuenciados en ambas direcciones por Macrogen Inc. (Seúl, República de Corea).



### III.- RESULTADOS

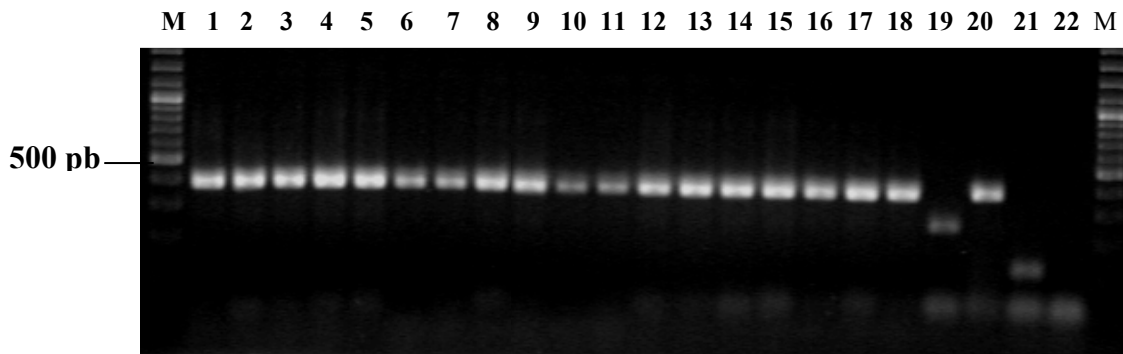
#### III.1.- Aislamiento e identificación de *Cylindrocarpon* spp.

En el momento en el que se arrancaron las plantas en las parcelas de Aiello de Malferit y de Rotglà i Corberà, ya se pudieron apreciar a simple vista algunos de los síntomas típicos descritos para la enfermedad del pie negro de la vid, como reducción de barbada y lesiones necróticas en las raíces. En cambio, las plantas control mantenidas en invernadero no mostraron ninguno de esos síntomas, apareciendo con barbada abundante y sana. En la Figura 2 puede observarse la diferencia entre una de las plantas control del cultivar Palomino y tres plantas del mismo cultivar procedentes de la parcela de Aiello de Malferit. En las plantas afectadas se observaron diferentes niveles de afección, de forma que mientras algunas aún conservaban algunas raicillas, en otras el sistema radicular quedó reducido a la raíz principal, e incluso en alguna planta, como puede apreciarse en la Figura 2, el tamaño de la raíz principal era muy reducido. Además, todas las plantas presentaron lesiones necróticas. En los aislamientos realizados a partir de estas lesiones en PDAS, se aislaron frecuentemente colonias fúngicas cuyo color y tamaño se correspondían con los caracteres morfológicos típicos de *Cylindrocarpon* spp., confirmándose mediante la observación al microscopio la presencia tanto de macroconidios como de microconidios y conidióforos característicos del género. Por el contrario, todos los aislamientos realizados en las plantas control fueron negativos para *Cylindrocarpon* spp.



**Figura 2.** Aspecto de las raíces de plantas de vid del cultivar Palomino. A: planta control cultivada en invernadero con abundante barbada. B: tres plantas procedentes de la parcela de Aiello de Malferit cuyas raíces muestran distintos grados de reducción del sistema radical y lesiones necróticas.

En total se obtuvieron 112 aislados de *Cylindrocarpon* spp., y para su identificación específica se realizó una PCR múltiple en la que todos los aislados se amplificaron usando tres pares de cebadores (Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 y Pau1/MaPa2), obteniéndose el mismo tamaño de banda para todos ellos, 387 pb (Figura 3) correspondiente a la especie *Cylindrocarpon macrodidymum*.



**Figura 3.** Identificación de aislados de *Cylindrocarpon macrodidymum* obtenidos de raíces de plantas trampa de vid mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando tres pares de cebadores específicos, Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2, y Pau1/MaPa2. Líneas 1 a 18: aislados positivos del cultivar Bobal en Aiello de Malferit (Líneas 1, 6, 7 y 9), patrón 41-B en Aiello de Malferit (Líneas 2, 3, 4 y 5), Palomino en Rotglà i Corberà (Líneas 8, 12, 13, 14, 15, 16 y 17), Bobal en Rotglà i Corberà (Línea 18), y patrón 41-B en Rotglà i Corberà (Líneas 10 y 11); líneas 19 a 21, control positivo (DNA de cultivo puro) de *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* y *C. pauciseptatum*, respectivamente; línea 22, control negativo; líneas M, marcador de DNA de 100-pb.

En las Tablas 2 y 3 se muestra el porcentaje de plantas infectadas y el porcentaje de puntos de aislamiento positivo en las plantas infectadas por *C. macrodidymum* en los cultivares Bobal y Palomino, y en el patrón 41-B en las parcelas de Aiello de Malferit y Rotglà i Corberà, respectivamente. En la parcela de Aiello de Malferit, el número de plantas infectadas con *C. macrodidymum* fue muy similar tanto en los dos cultivares (Bobal y Palomino), como en el patrón 41-B, situándose los porcentajes de plantas infectadas entre el 50 % para el cultivar Palomino y el 56,3 % para Bobal. El porcentaje de puntos de aislamiento positivo en las plantas infectadas por *C. macrodidymum* también resultó muy parecido, variando entre el 28,6 % del patrón 41-B y el 36,3 % del cultivar Bobal.

**Tabla 2.** Plantas infectadas (%) y puntos de aislamiento positivo (%) para *Cylindrocarpon macrodidymum* en plantas de vid de los cultivares Bobal y Palomino, y patrón 41-B en la parcela de Aiello de Malferit.

<b>Aiello</b>	<b>Nº plantas analizadas</b>	<b>Nº plantas infectadas</b>	<b>% plantas infectadas<sup>a</sup></b>	<b>% puntos de aislamiento positivo<sup>b</sup></b>
<b>Bobal</b>	23	13	56,6	36,3
<b>Palomino</b>	22	11	50,0	29,9
<b>41-B</b>	22	12	54,6	28,6

<sup>a</sup> (número de plantas infectadas con *C. macrodidymum* / número de plantas analizadas) x 100.

<sup>b</sup> porcentaje de puntos de aislamiento positivo en las plantas infectadas por *C. macrodidymum*, del total de puntos de aislamiento realizados (7 puntos por planta).

En la parcela de Rotglà i Corberà, los porcentajes de plantas infectadas con *C. macrodidymum* no fueron tan parecidos entre los cultivares y el patrón como en Aiello. Mientras que para el patrón 41-B y el cultivar Bobal los porcentajes fueron del 10 % y del 13,3 % respectivamente, en el cultivar Palomino el porcentaje fue más alto, del 48 %. En cuanto al porcentaje de puntos de aislamiento positivo en las plantas infectadas por *C. macrodidymum*, los valores fueron del 14,3 % para el cultivar Bobal, del 29,8 % para el cultivar Palomino y del 28.6 % para el patrón 41-B.

**Tabla 3.** Plantas infectadas (%) y puntos de aislamiento positivo (%) para *Cylindrocarpon macrodidymum* en plantas de vid de los cultivares Bobal y Palomino, y patrón 41-B en la parcela de Rotglà i Corberà.

<b>Rotglà</b>	<b>Nº plantas analizadas</b>	<b>Nº plantas infectadas</b>	<b>% plantas infectadas<sup>a</sup></b>	<b>% puntos de aislamiento positivo<sup>b</sup></b>
<b>Bobal</b>	15	2	13,3	14,3
<b>Palomino</b>	25	12	48,0	29,8
<b>41-B</b>	10	1	10,0	28,6

<sup>a</sup> (número de plantas infectadas con *C. macrodidymum* / número de plantas analizadas) x 100.

<sup>b</sup> porcentaje de puntos de aislamiento positivo en las plantas infectadas por *C. macrodidymum*, del total de puntos de aislamiento realizados (7 puntos por planta).

### III.2.- Aislamiento e identificación de hongos asociados a la enfermedad de Petri

En las mismas plantas en las que se realizó el aislamiento de hongos de las raíces, se realizó también el aislamiento de los hongos responsables de la enfermedad de Petri, pero en este caso a partir de pequeños discos de la zona basal del tallo.

En estas plantas no se observó ningún síntoma de necrosis vascular, aunque sí que se consiguió el aislamiento de algunas colonias fúngicas aunque con muy baja frecuencia. Concretamente, en las plantas procedentes de la parcela de Aiello de Malferit, sólo se consiguieron aislamientos positivos en tres plantas, siendo las tres del patrón 41-B. En una de esas plantas se aisló una colonia de la especie *Cadophora luteo-olivacea* y una colonia de *Phaeoacremonium aleophilum*, mientras que en las otras dos se aislaron dos colonias de *Ca. luteo-olivacea*, una en cada una de las plantas.

En las plantas procedentes de la parcela de Rotglà i Corberà se consiguieron aislamientos positivos en siete plantas, dos del cultivar Bobal y cinco del cultivar Palomino. En las dos plantas del cultivar Bobal se aislaron dos colonias de *Ca. luteo-olivacea*, una en cada una de las plantas, mientras que en las plantas del cultivar Palomino se aislaron dos colonias de *Ca. luteo-olivacea* y tres de *Phaeoacremonium parasiticum*, una en cada una de las cinco plantas.

Las plantas control cultivadas en invernadero no mostraron ningún síntoma de la enfermedad y no se consiguió el aislamiento de ninguno de los patógenos responsables de la enfermedad de Petri a partir de estas plantas.

## IV.- DISCUSIÓN

Este trabajo confirma la presencia en el suelo de campos de viveros de vid de hongos patógenos responsables de la enfermedad del pie negro de la vid y de la enfermedad de Petri. Las especies *C. macrodydimum*, *Ca. luteo-olivacea*, *Pm. aleophilum* y *Pm. parasiticum* fueron aisladas en plantas trampa de vid, plantadas en estos campos.

Los resultados obtenidos demuestran que la especie *C. macrodydimum* es capaz de infectar en muy poco tiempo a un elevado número de plantas, sin distinción de que éstas fueran procedentes de semilla de patrón o de variedad. A pesar de que varias especies de *Cylindrocarpon* han sido identificadas en las diferentes regiones productoras del mundo como las responsables del pie negro de la vid y la muerte de estas plantas, tanto en viveros como en plantaciones jóvenes (Halleen *et al.*, 2006; Schroers *et al.*, 2008), en este estudio sólo se han obtenido aislamientos de *C. macrodydimum*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Alaniz *et al.* (2007) que demuestra que *C. macrodydimum* es la especie predominante en todas las regiones productoras de España. Las plantas de vid afectadas por este patógeno mostraron daños fácilmente observables a simple vista, tales como la reducción del sistema radicular o lesiones necróticas.

*Cylindrocarpon* es un patógeno del suelo que produce clamidosporas que le permiten sobrevivir largos periodos de tiempo (Braydford, 1993; Halleen *et al.*, 2004), sin embargo, hay muy poca información acerca del tiempo que pueden sobrevivir las especies de este género en el suelo en ausencia de hospedantes y del papel que juegan las clamidosporas en la infección de las plantas (Alaniz *et al.*, 2009b). El elevado número de aislados de *C. macrodydimum* obtenidos en este trabajo y el hecho de que se infectaran un gran número de plantas en tan poco tiempo, podría deberse al elevado nivel de inóculo en suelo y a que esta especie sea capaz de producir una gran cantidad de estructuras de resistencia como conidios o clamidosporas que le permitirían sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo, o también a su capacidad para sobrevivir en restos de cultivo u hospedantes alternativos como malas hierbas.

El patógeno vascular *Ca. luteo-olivacea* fue aislado sólo en algunas plantas de vid. En los últimos años, esta especie ha sido identificada frecuentemente en plantas de vid con síntomas de decaimiento en diferentes regiones productoras como California (Rooney-Latham, 2005), Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2007), Uruguay (Abreo *et al.*, 2008), Nueva Zelanda (Manning y Munday, 2009), Norteamérica (Rolhausen *et al.*, 2010) y España (Gramaje *et al.*, 2010) y se ha demostrado su patogenicidad tanto en invernadero como en campo (Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2010). No existe mucha información disponible acerca del papel de este hongo en el decaimiento y muerte de las viñas jóvenes, pero el incremento en la frecuencia de aislamiento de esta especie en numerosos viñedos de todo el mundo hace necesaria una futura investigación sobre la distribución y la epidemiología de este patógeno. Este trabajo aporta información preliminar sobre el posible papel de *Ca. luteo-olivacea* como patógeno del suelo en el cultivo de la vid, que puede ser útil para mejorar el conocimiento de la biología y epidemiología esta especie.

En este estudio se han aislado dos especies del género *Phaeoacremonium*: *Pm. aleophilum* y *Pm. parasiticum* en las plantas trampa. La primera de ellas está considerada como la especie de *Phaeoacremonium* más común y ampliamente distribuida en las principales regiones vitícolas del mundo, mientras que la segunda es también de aislamiento frecuente en plantas de vid (Mostert *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2009; Graham *et al.*, 2009). Ambas especies se han detectado con muy baja frecuencia; esto puede ser debido a que el nivel de inóculo en suelo es muy bajo o a que, según Aroca *et al.* (2010), estos patógenos quizás requieran un mayor nivel de colonización en el hospedante para ser detectados mediante el aislamiento en medio de cultivo.

No existe mucha información acerca del comportamiento y supervivencia de *Phaeoacremonium* spp. en el suelo, aunque es sabido que no forma clamidosporas ni se han citado otras estructuras de resistencia. Según Rooney *et al.* (2001) *Phaeoacremonium* spp. podría sobrevivir en el suelo, colonizando restos vegetales como viejos frutos o pequeñas ramas. También es posible que sobreviva colonizando hospedantes alternativos situados en parcelas vecinas; *Pm. aleophilum* ha sido aislado en numerosas especies leñosas como el kiwi (*Actinidia chilensis*), el olivo (*Olea europaea*), *Prunus* spp. y *Salix* spp. en varios países (Mostert *et al.*, 2006). Otra

posibilidad podría ser que colonizara malas hierbas características de campos de vid, aunque todavía no se ha realizado ningún estudio que lo investigue.

Aunque varios autores ya confirmaron en estudios anteriores la presencia de varias especies de *Phaeoacremonium* tanto en suelos de viveros de vid como en suelos de viñedos (Rooney *et al.*, 2001; Dupont *et al.*, 2002; Retief *et al.*, 2006), este trabajo es el primero en el que se demuestra que hongos del género *Phaeoacremonium* son capaces de infectar el sistema vascular de plantas de vid sanas a través de las raíces a partir de suelo naturalmente infestado. Hasta la fecha sólo se había conseguido la infección de plantas sanas de vid a partir del suelo pero de manera artificial, mediante inoculación de varias especies de *Phaeoacremonium* mediante riego con suspensiones de conidios (Gramaje *et al.*, 2007; Aroca *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2008; Aroca y Raposo, 2009). Otra vía de entrada de los hongos del género *Phaeoacremonium* en las plantas es por vía aérea a través de heridas de poda, ya que sus esporas se pueden diseminar por el aire (Mostert *et al.*, 2006). No obstante, en las plantas trampa no se realizó ninguna labor de poda durante el ciclo de cultivo con lo que, en nuestro caso, esa vía puede ser descartada.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, se ha confirmado que *C. macrodydimum* es un habitante común en suelos de viveros de vid y se ha demostrado que *Ca. luteo-olivacea*, *Pm. aleophilum* y *Pm. parasiticum* son también habitantes de estos suelos. Todos ellos infectaron las plantas trampa de vid. Por tanto, sería conveniente tomar una serie de medidas de control para eliminar o reducir los niveles de inóculo de estos hongos en el suelo. Las plantas utilizadas en este estudio fueron sembradas en viveros de vid, más concretamente en un campo de plantas madre de patrones y en un campo de enraizamiento. Ya que estos patógenos afectan especialmente a plantas jóvenes, sería por tanto conveniente que las nuevas plantaciones se realizaran en parcelas en las que anteriormente no hubiera habido cultivo de plantas de vid. En ese sentido, el método de plantas trampa desarrollado en este estudio podría ser una herramienta eficaz a la hora de detectar estos hongos en el suelo de las parcelas donde se va a realizar la plantación. Además, habría que llevar a cabo una serie de prácticas culturales que contribuyan a reducir el nivel de inóculo de estos hongos en el suelo, como la eliminación de malas hierbas y de restos de cultivo, que podrían servir de hospedantes alternativos. Asimismo, el suelo no debe estar compactado ni anegado para

favorecer el desarrollo del sistema radical. Estas prácticas culturales se podrían complementar con la utilización de materias activas fungicidas. A nivel experimental, diversos autores han evaluado otras alternativas con resultados prometedores para el control del pie negro de la vid. Según Halleen *et al.*, (2006) la incorporación al suelo de enmiendas con *Trichoderma* spp., micorrizas y composts aumenta la resistencia de las plantas ante esta enfermedad, mientras que Petit y Gubler (2006) demostraron que la inoculación de las raíces de las plantas de vid con la micorriza *Glomus intraradices* ayuda a prevenir el desarrollo de la enfermedad tanto en viveros como en plantaciones definitivas.



## V.- BIBLIOGRAFÍA

Abreo, E., Lupo, S., Martínez, I. y Bettucci, L. (2008). Fungal species associated to grapevine trunk diseases in Uruguay. *Journal of Plant Pathology* 90(3): 591.

Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L. y Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39: 446-452.

Alaniz, S., Armengol, J., León, M., García-Jiménez, J. y Abad-Campos, P. (2009a). Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113: 16-23.

Alaniz, S., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. y Armengol, J. (2009b). El pie negro de la vid causado por *Cylindrocarpon*. *Tierras de Castilla y León* 156: 120-125.

Alaniz, S., León, M., García-Jiménez, J., Abad, P. y Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91: 1187-1193.

Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. y Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126: 165-174.

Aroca, A., Luque, J. y Raposo, R. (2008). First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevines in Spain. *Plant Pathology* 57 (2): 386.

Aroca, A. y Raposo, R. (2007). PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2911-2918.

- Aroca, A. y Raposo, R. (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. *Journal of Phytopathology* 157: 413-419.
- Braydford, D. (1993). *Cylindrocarpon* en Singleton, L.L., Mihail, J.D. y Rush, C.M. Eds. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi 103-106. APS Press St Paul, Minnesota. 265 pp.
- Damm, U. y Fourie, P. (2005). A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil. *South African Journal of Science* 101: 135-139.
- De Francisco, M.T., Martín, L., Cobos, R., García-Benavides, P. y Martín, M.T. (2009). Identification of *Cylindrocarpon* species associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 48: 167.
- Dupont, J., Magnin, S., Césari, C. y Gatica, M. (2002). ITS and  $\beta$ -tubulin markers help delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *P. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research* 106: 1143-1150.
- Gams, W. (2000). *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. *Studies in Mycology* 45: 187-199.
- Gardes, M. y Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113-118.
- Glass, N.L. y Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1332-1336.
- Graham, A., Johnston, P.R. y Weir, B.S. (2009). Three new *Phaeoacremonium* species on grapevines in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38: 505-513.

Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2007). First report of *Phaeoacremonium mortoniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91 (9): 1206.

Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2008). First report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevines in Spain. *Plant Disease* 92 (5): 836.

Gramaje, D., Armengol, J., Mohammadi, H., Banihashemi, Z. y Mostert, L. (2009). Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevines in Iran and Spain. *Mycologia* 101 (6): 920-929.

Gramaje, D., Mostert, L. y Armengol, J. (2010). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *Cadophora melinii* isolates obtained from grapevine nurseries and plants in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 49:104.

Gubler, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Rooney Latham, S., Petit, E. y Bayramian, L.A. (2004). Root diseases of grapevine in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33: 157-165.

Halleen, F., Fourie, P.H. y Crous, W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S55-S67.

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

Halleen, F., Schroers, H.J., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431-455.

Harrington, T.C. y McNew, L. (2003). Phylogenetic analysis places the *phialophora*-like anamorph genus *Cadophora* in the Heliotales. *Mycotaxon* 87: 141-151.

Manning, M.A. y Munday, D.C. (2009). Fungi associated with grapevine trunk disease in established vineyards in New Zealand. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 160-161.

Mostert, L., Groenewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W. y Crous P.W. (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology* 54: 1-115.

Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P. y Crous, P.W. (2006). A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S12-S29.

Oliveira, H., Rego, M.C. y Nascimento, T. (2004). Decline of Young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae* 652: 295-304.

Petit, E. y Gubler, W.D. (2006). Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease* 90: 1481-1484.

Retief, E., McLeod, A. y Fourie, P.H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115: 331-339.

Ridgway, H.J., Steyaert, J.M., Pottinger, B.M., Carpenter, M., Nicol, D. y Stewart, A. (2005). Development of an isolate-specific marker for tracking *Phaeomoniella chlamydospora* infection in grapevines. *Mycologia* 97 (5): 1093-1101.

Ridgway, H., Whiteman, S.A., Jaspers, M.V. y Stewart, A. (2003). Molecular diagnostics for industry: sources of Petri Disease in grapevine nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 152.

Rolhausen, P.E., Wilcox, W. y Baumgartner, K. (2010). Distribution and occurrence of fungi associated with grapevine trunk diseases in Northeastern American vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 49:105.

Rooney, S.N., Eskalen, A. y Gubler, W.D. (2001). Recovery of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S351-S356.

Rooney-Latham, S. (2005). Etiology, epidemiology and pathogen biology of Esca disease of grapevines in California. Ph.D. dissertation, University of California, Davis, United States. Publication No. AAT 3191148.

Schroers, H.-J., Zerjav, M., Munda, A., Halleen, F. y Crous, P.W. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research* 112: 82-92.

Whiteman, S.A., Jaspers, M.V., Stewart, A. y Ridgway, H.J. (2003). Identification of potential sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in the grapevine propagation process. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 152.