

RESUMEN de la tesis de **Luis Gabriel Morales Pedraza** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGIA. Ensenada, Baja California, Noviembre de 2010.

Caracterización de hongos asociados a la enfermedad de Petri y Esca en el valle de Guadalupe, Baja California.

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Tesis

La vid (*Vitis vinifera* L.) es el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo y uno de los más importantes del estado de Baja California. Las enfermedades de la madera de vid son causadas por hongos que parasitan el xilema de las plantas, taponeando sus haces e impidiendo la circulación de la savia. Estas enfermedades son responsables de grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. El complejo de la Esca es uno de los padecimientos más destructivos de la vid y es conocido en todas las regiones vitivinícolas del mundo. *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. han sido identificados como los principales agentes causales del complejo. Recientemente se han observado viñas con síntomas de Esca en el valle de Guadalupe, la zona vitivinícola con mayor importancia del país y que está localizada a 30 km de la ciudad de Ensenada. Para determinar la presencia de estos hongos se realizaron muestreos del 2008 al 2010 en viñedos de los alrededores de la ciudad de Ensenada. Se obtuvieron 23 aislados putativos de *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium*. Los aislados fueron identificados por sus características morfológicas y el análisis filogenético de los marcadores moleculares: espaciador transcrito interno (ITS) y la secuencia parcial del gen de la β -tubulina para todos los aislados; la secuencia parcial del gen de la actina para los aislados putativos de *Phaeoacremonium* y la secuencia parcial del gen del factor de elongación de la traducción 1- α (EF1- α) para los de *P. chlamydospora*. Ambos análisis resultaron en la identificación de 9 aislados como *Phaeoacremonium aleophilum*, y 14 como *P. chlamydospora*. Para evaluar la capacidad de causar lesiones, algunos aislados se inocularon en tejido verde de vid. Después de 30 días, se observó que los 5 aislados de *P. chlamydospora* probadas causaron lesiones con mayor necrosis y extensión que *P. aleophilum*. Así, este trabajo reporta la presencia de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* en viñas con síntomas de Esca joven en Baja California.

Palabras clave: Vid, Enfermedades de la madera, Esca.

ABSTRACT of the dissertation presented by Luis Gabriel Morales Pedraza, as part of the requirements to obtain the MASTERS IN SCIENCE degree with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, November 2010.

Characterization of fungi associated to Petri disease and Esca in Guadalupe's valley, Baja California.

Grapevine is the most economically important fruit crop in the world and one of the most important in Baja California, Mexico. Grapevine trunk diseases are caused by fungi that parasite the plant's xylem disrupting the sap circulation. These diseases are responsible for great economic losses around the world. Esca disease complex is one of the most destructive diseases of grapevine and it is known all around the world. *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. have been identified as the principal pathogens of the complex. Recently, vines showing Esca symptoms have been observed in Guadalupe's valley, which is the most important grapevine growing zone in the country, and is located 30 km from Ensenada city. To determine the presence of these fungi, a three years survey was done from 2008-2010. Samples were taken from vineyards near Ensenada city. A total of 23 putative *P. chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. isolates were obtained. Isolates were identified by their morphological characteristics and the phylogenetic analysis of the following molecular markers: the internal transcribed spacer (ITS) and the β -tubulin gene partial sequence for all isolates; the actin gene partial sequence for the putative *Phaeoacremonium* isolates and the translation elongation factor 1- α (EF1- α) gene partial sequence for *P. chlamydospora*. Both analyses resulted in the identification of 9 isolates as *Phaeoacremonium aleophilum* and 14 as *P. chlamydospora*. To evaluate the ability of some isolates to cause lesions, green tissue of 1 year old Cabernet Sauvignon vines were infected. After 30 days, it was clear that the *P. chlamydospora* isolates produced more necrosis than the *P. aleophilum* isolates. This work reports the presence of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in grapevines showing young Esca in Baja California.

Key words: Grapevine, Trunk diseases, Esca.

Dedicatorias

Para mis padres José Luis y Leticia.

Para Alejandra.

Agradecimientos

A mis padres por haberme enseñado a no darme por vencido por más desalentadora que fuera la situación, por su apoyo incondicional a través de los años y especialmente este último, por todos los consejos que creí eran regaños y llegue a entender años después, por haber sembrado en mi la semilla del amor por el conocimiento y el aprendizaje, por dejarme ser yo y no limitarme ni haberme impuesto nada en mi vida. Soy lo que soy gracias a ustedes, los amo.

A mi padre en especial por haberme repetido miles de veces que el malhecho trabaja doble y por alentarme a no ser conformista y crear una opinión propia.

A mi madre en especial por alentarme a correr riesgos ya que hay oportunidades que solo se presentan una vez en la vida.

A mi hermano por haber escuchado mis problemas y aconsejarme en esta etapa de mi vida la cual ha sido muy difícil.

A Alejandra, Rosa y Fabián por el apoyo que me brindaron el los últimos años de mi carrera y durante la maestría. Ale, no tienes idea lo que fue para mí que convirtieras mis días difíciles en fáciles con solo una sonrisa, gracias por permitirme crecer junto a ti, no hay palabras para expresar cuanto te amo güera.

A Constanza, Jovani, Daniel, Adriana, Carolina, Gabriela y Celso por estar ahí cuando más los necesité; aprendí mucho de ustedes, son parte del grupo de personas que cambiaron mi vida, los amo.

A Constanza especialmente por haber cambiado radicalmente mi manera de pensar. Tendrás por siempre un lugar muy especial en mi corazón, te adoro mujer.

A mi directora de tesis y amiga la Dra. Rufina, por haberme tenido paciencia y guiado desde que empecé a trabajar en el laboratorio, muchas gracias.

A mis sinodales la Dra. Ernestina, la Dra. Pilar y al Dr. Tomas por sus consejos, muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de manutención para realizar mis estudios de maestría, a University of California Institute for Mexico and The United States (UC MEXUS) y a la Fundación Produce de Baja California por financiar parte de mi proyecto de tesis, GRACIAS.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	4
Generalidades sobre la vid	4
Vitivinicultura en México.....	5
Enfermedades de la vid	6
Enfermedades de la madera en vid	7
Hongos traqueomicóticos involucrados en la Esca.....	9
Rutas de infección	15
Edad del viñedo y expresión de síntomas.....	16
El papel de las toxinas en la expresión de síntomas foliares	17
Características microscópicas de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y <i>Phaeoacremonium</i> spp	18
Aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de especies	22
Justificación	25
Hipótesis	25
Objetivos	26
General	26
Particulares	26

CONTENIDO (continuación)

	Página
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Muestreo	27
Aislamiento y mantenimiento de cepas	28
Caracterización morfológica.....	29
Extracción de ADN	30
Amplificación por PCR de fragmentos de los genes factor de elongación de la traducción 1- α , β -Tubulina, Actina y la región ITS2-5.8S-ITS1	31
Análisis de secuencias.....	34
Ensayos de patogenicidad	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
Muestreo	37
Caracterización morfológica de los aislados	41
Caracterización de los aislados putativos de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .	41
Caracterización de los aislados putativos de <i>Phaeoacremonium</i>	44
Caracterización genética.....	47
Ensayos de patogenicidad	58
V. CONCLUSIONES	62
VI. GLOSARIO	64
VII. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Conidióforos y conidios de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> . Barra = 10 µm. Tomado de Crous y Gams, 2000.	19
2	Tipos de fiálide que presenta el género <i>Phaeoacremonium</i> . A) I, B) II, C) III. Tomado de Mostert <i>et al.</i> , 2006.	21
3	Distintas formas del tipo de fiálide III, que presenta el género <i>Phaeoacremonium</i> . Tomado de Mostert <i>et al.</i> , 2006.	22
4	Municipios de Baja California con actividad Vitivinícola.	28
5	A) Viña con síntomas foliares observada en el valle de Guadalupe. B y C) Signos en herida de poda observados en algunas plantas de vid: Puntos concéntricos de color marrón y cancro en forma de cuña, respectivamente.	38
6	Ejemplos de la coloración que presentaron los aislados de <i>P. chlamydospora</i> , en medio PDA, después de 4 semanas de incubación a 25°C A) STCSBM10-2, B) CC42-2, C) STCSBM7-2, D) R09.	42
7	Estructuras somáticas y reproductivas de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , observados en microscopia de contraste de fases. A) Estructuras parecidas a clamidosporas, B) Micelio aéreo con cúmulos de conidios, C y D) Hifas maduras con conidióforos y fiálides. Barra = 10 µm.	43
8	Morfología colonial de los algunos aislados de <i>Phaeoacremonium</i> después de 4 semanas de incubación a 25°C. A) Temp02, B) STCSBM14-02.	44
9	Conidióforos de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> observados por microscopía de contraste de fases. A y B) Fiálides de tipo III, C) Fiálides tipo III y II, E) Fiálide de tipo II, D) Conidióforo ramificado con fiálides elongadas-ampuliformes tipo III. Barra = 10 µm.	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias del ITS de los aislados de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	52
11	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen del factor de elongación 1- α (EF1- α) de los aislados de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras aisladas en España, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	53
12	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de la β -tubulina de los aislados de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	54
13	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias del ITS de los aislados de <i>Phaeoacremonium</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	55
14	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de la β -tubulina de los aislados de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
15	Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de Actina de los aislados de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.	57
16	Longitud con error estándar de las lesiones provocadas por la inoculación de aislados de <i>P. chlamydospora</i> (CC40-2, R09, SA32, STCSBM10-2, STCSBM07-2), y <i>Phaeoacremonium</i> (BY02-3, STCSBM14-02, Temp02) en tejido verde de vid por 30 días.	58
17	Lesiones ocasionadas por la inoculación de aislados de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (A, B, C, D) y <i>Phaeoacremonium</i> (F, G, H). A) STCSMB10-2, B) SA32, C) R09, D) STCSMB07-2, E) CC40-2, F) ST14-02, G) TEMP02, H) BY02-3, I) Control.	59
18	Aislados recuperados después de 30 días de su inoculación en tejido verde de vid. A) CC40-2, B) BY02-3, C) Control.	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Lista de especies de <i>Phaeoacremonium</i> asociados al complejo de la Esca y su país de origen. (Modificado de Mostert <i>et al.</i> , 2006.)	20
II	Aislados identificados como <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y <i>Phaeoacremonium</i> spp. obtenidos durante los muestreos 2008-2010.	39
III	Secuencias amplificadas por PCR usadas para realizar los análisis filogenéticos.	47

Introducción

La vid, viña o parra (*Vitis vinifera* L.), es el cultivo frutal con mayor importancia económica en el mundo. El cultivo de vid en grandes extensiones de terreno en México se lleva a cabo en Sonora y Baja California. En el 2007 en México se cultivaron alrededor de 40,000 ha de vid con una producción de 250,000 ton de uva (FAO, 2007). Los valles de Baja California tienen en promedio una producción anual de vino de 1, 100,000 cajas de 12 botellas, de las cuales aproximadamente el 90% se venden en el mercado nacional y el 10% restante en el mercado internacional (Sistema Producto Vid). En el valle de Guadalupe es en donde se produce la mayor cantidad de uva para vinificación en el país, por lo que la vitivinicultura tiene una influencia muy grande sobre la economía de la región creando empleos directa e indirectamente.

La vid es afectada por varios tipos de padecimientos: enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y daño por insectos. Las enfermedades de la madera de vid o del tronco, son un grupo de padecimientos distribuidos mundialmente y son ocasionados principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Botryosphaeria*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella*, *Fomitiporia* y *Eutypa*. Estos hongos parasitan el xilema de las plantas obstruyendo las traqueidas y por ende impidiendo el flujo de la savia (traqueomicosis o hadromicosis) (Martin *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2007). Algunos de los padecimientos que estos hongos ocasionan son la Eutipiosis, la enfermedad de Petri, la Esca y el brazo

muerto que en general producen decaimiento o deterioro de la planta (Martin *et al.*, 2005). Los principales síntomas producidos por las enfermedades del tronco son la disminución en la productividad de la planta, la muerte de los brazos, el deterioro progresivo, fallo en los injertos, muerte de los brotes, síntomas foliares como clorosis y necrosis, podredumbre blanca del tronco y necrosis con coloración oscura en forma de cuña en el tronco (Aroca *et al.*, 2007).

Phaeoacremonium aleophilum y *Phaeomoniella chlamydospora* han sido identificados como los principales agentes causales del complejo de la Esca en injertos y plantas con síntomas de Enfermedad de Petri y Esca en invernaderos y viñedos en España (Aroca *et al.*, 2006, Giménez *et al.*, 2006), Australia (Edwards y Pascoe, 2004; Edwards *et al.*, 2007), Francia (Larignon y Dubos, 1997), Italia (Calzarano y Di Marco, 2007), California EUA (Gubler *et al.*, 2004) y Polonia (Krol, 2006). Durante varios años *Phaeomoniella chlamydospora* (antes llamado *Phaeoacremonium chlamydosporum*) estuvo agrupado dentro del género *Phaeoacremonium*. A partir de las diferencias morfológicas, de cultivo y las diferencias moleculares que se observaron entre *P. chlamydosporum* y otras especies de *Phaeoacremonium*, Crous y Gams (2000) separaron a *P. chlamydosporum* del género, transfiriéndolo con su epíteto específico al género *Phaeomoniella*, en el cual solo se encontraban dos especies más.

Dependiendo en la edad de la viña y el hongo involucrado, diferentes tipos de enfermedades pueden surgir: Enfermedad de Petri y Esca joven, si los hongos que colonizan el xilema de la planta son *Phaeomoniella chlamydospora* y/o *Phaeoacremonium aleophilum*; pudrición blanca si el hongo es exclusivamente *Fomitiporia* sp., y Esca propiamente dicha si los tres hongos colonizan la misma planta (Surico *et al.*, 2008).

El desarrollo de estos padecimientos es lento y la aparición de síntomas suele ser errática, además parece estar influenciado por las condiciones de humedad y temperatura así como al estrés al que son sometidas las plantas, hechos que dificultan su estudio (Martín et al., 2005). Debido a que los síntomas pueden ser ocasionados por uno o más patógenos, la determinación del agente causal a partir de la sintomatología no es posible, por lo que es necesario el aislamiento del o los organismos que causan el padecimiento.

En este trabajo se realizó un análisis detallado de los agentes causales del complejo de la Esca, los cuales fueron aislados de viñas provenientes del valle de Guadalupe, Baja California. Los aislados fueron analizados morfológica y genéticamente para lograr su caracterización. También se evaluó la patogenicidad de algunos de ellos en viñas del cultivar Cabernet-Sauvignon.

II

Antecedentes

Generalidades sobre la Vid

El género *Vitis* (familia *Vitaceae*) contiene 60 especies que son nativas de las zonas templadas del hemisferio norte, con algunas especies que habitan en los trópicos. En norte América existen alrededor de 25 especies; en Europa existe una sola especie, *Vitis vinifera*, y en Asia *Vitis amurensis* y *Vitis coignetiae*. *Vitis vinifera* L. es la especie con más importancia económica del género ya que con sus frutos se elaboran vinos, licores, jugo y pasas (Vaughan *et al.*, 2009).

La vid es una trepadora vigorosa, sus hojas miden de 9 a 28 cm de ancho, son palmeadas lobuladas y dentadas en los bordes. Los pétalos de sus flores son de un tono verde, las cuales por lo regular son pentámeras. Su fruto, el cual es una baya, es llamado uva. Al igual que los demás cultivos frutales, en un principio las uvas fueron recolectadas a partir de plantas silvestres. Se han encontrado semillas de *Vitis vinifera sylvestris* (la variedad silvestre) en sitios arqueológicos que datan del neolítico tardío (4500 a. C.) en Chipre, de la edad de cobre temprana (3200 a. C.) en la ciudad de Jericó; Cisjordania, y en otras partes cercanas a las costas del Mediterráneo (Vaughan *et al.*, 2009).

En cuanto al origen de la Vitivinicultura y a la producción de vino, se sabe por los jeroglíficos fechados en Egipto que estas actividades ya se

realizaban en el 2400 a. C. Aunque el área exacta de domesticación de la vid es todavía una incógnita. Lo que actualmente se conoce como Armenia es uno de los lugares a los que se hace referencia, pero gracias a evidencias arqueobotánicas, se ha sugerido que la viticultura comenzó en la costa este del Mediterráneo y fue llevada a otros países del Mediterráneo y al área del Mar Negro por los Fenicios y Griegos. Los romanos llevaron el cultivo a los países templados de Europa incluyendo Gran Bretaña. *Vitis vinifera* fue llevada al nuevo mundo en 1492 por Cristóbal Colón y posteriormente por exploradores españoles y portugueses a norte y Sudamérica. *Vitis labrusca* y *V. rotundifolia* son especies nativas de América, y no existe duda de que hayan ocurrido hibridaciones entre estas especies y la *V. vinifera* introducida (Vaughan *et al.*, 2009).

Los cultivares de *V. vinifera* son extremadamente numerosas, se estima que existen alrededor de 10, 000 de ellos. La vid actualmente es cultivada en más de 8 millones de hectáreas a nivel mundial lo cual la hace la planta más cultivada y el cultivo frutal con mayor importancia económica en el mundo (Urbez-Torres y Gubler, 2009).

Vitivinicultura en México

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los frutales más importantes en el norte de México, su fruto es destinado a la elaboración de vinos, uva de mesa y pasas. El valor de la producción nacional anual se ha cotizado en \$152 millones de dólares (Úrbez-Torres *et al.*, 2008) y constituye una fuente muy importante de empleos. El cultivo de vid en grandes extensiones de terreno en México se lleva a cabo en Sonora y Baja California. En el 2007 en México se tenían destinadas alrededor de 40,000 ha cultivadas con vid con una producción de

250, 000 ton de uva (FAO, 2007). En el estado de Baja California la extensión de terreno cultivada con vid es de 3,326 ha, con un volumen de producción de 30,760 ton, y continua en constante aumento (Sepúlveda, 2009).

Los valles de Baja California tienen en promedio una producción anual de vino de 1, 100,000 cajas de 12 botellas de 750 ml, de las cuales aproximadamente el 90% se venden en el mercado nacional y el 10 % restante en el mercado internacional (Sistema Producto Vid). En el valle de Guadalupe, BC es en donde se produce la mayor cantidad de uva para vinificación en el país y el 90% de la producción vinícola (Fuente: SIAP), por esta razón la vitivinicultura ejerce una influencia muy grande sobre la economía de la región debido a la creación de empleos ya sea directa o indirectamente.

Enfermedades de la vid

Al igual que todos los cultivos, la vid está expuesta enfermedades de varias índoles que repercuten de manera negativa en la cosecha disminuyendo su calidad y cantidad, al igual que en la salud de la planta, lo cual aumenta el costo de producción y afecta la calidad del producto derivado de la uva.

Estos padecimientos se pueden manifestar de diversas formas, por ejemplo: síntomas foliares como clorosis, necrosis, marchitez, muerte de bazos y cordones, pudrición de la raíz y daños al tronco, pudriciones y el taponamiento de los haces vasculares, lo que ocasiona disminución o la interrupción del flujo de agua y savia, ausencia de crecimiento y la pudrición del fruto.

Como ejemplo de una enfermedad bacteriana en vid se puede mencionar a

la enfermedad de Pierce, la cual es producida por *Xylella fastidiosa* cuyo vector es un insecto llamado *Homalodisca coagulata*. Este insecto se alimenta de la savia de la planta. En EUA, la enfermedad se encuentra distribuida desde California hasta Florida. Las plantas infectadas mueren en pocos meses, pero algunas pueden vivir varios años después de la infección. La enfermedad de Pierce es más severa en plantas jóvenes y vigorosas, especialmente en áreas cálidas (Agrios, 2005).

En cuanto a enfermedades causadas por virus, el virus de la hoja de abanico (grape fan leaf virus, GFLV) se distribuye por todo el mundo. Esta enfermedad puede ser causada por varias cepas del virus y manifestar distintos síntomas pero siempre ocasiona pérdidas severas. Dependiendo de la cepa del virus, las hojas infectadas pueden presentar mosaicos cloróticos, anillos, puntos o patrones de líneas. En la mayoría de las variedades, la infección causa el crecimiento de hojas ligeramente asimétricas, mientras en otras las venaciones están dispuestas anormalmente lo que le da la apariencia de un abanico (Agrios, 2005).

Enfermedades de la madera de vid

Bajo esta denominación se agrupan varios padecimientos distribuidos mundialmente los cuales se asocian con hongos endófitos que parasitan el sistema vascular de las plantas (traqueomicosis o hadromicosis), obstruyendo los haces vasculares e impidiendo el flujo de savia (Martin *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2007). Los principales hongos que ocasionan estos padecimientos pertenecen a los géneros *Botryosphaeria* (Anamorfo de los géneros: *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*), *Phaeoacremonium* (Anamorfo de los género

Togninia), *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia* y *Eutypa*. Estas enfermedades son de evolución lenta y la aparición de los síntomas suele ser errática, lo cual dificulta su estudio (Martín *et al.*, 2005).

Las enfermedades de la madera de vid son responsables de grandes pérdidas económicas a las empresas vinícolas alrededor del mundo, ya que reducen la producción y aumentan sus costos. Los costos de producción aumentan como resultado de la implementación de medidas preventivas culturales como la remoción de madera enferma de las viñas después que estas enferman. En California EUA, la pérdida neta en la industria vinícola causada por los padecimientos provocados por *Eutypa* y *Botryosphaeria*, fueron estimados en \$260 millones de dólares Americanos por año (Siebert, 2001). El impacto de estos padecimientos puede ser significativo en viñedos antiguos y usualmente el daño suele ser más severo a medida que envejecen (Gubler *et al.*, 2004).

Algunos de los padecimientos que estos hongos ocasionan son la Eutipiosis, el complejo de la Esca y el Brazo muerto, que en general producen decaimiento o deterioro de la planta (Martin *et al.*, 2005). Los principales síntomas de las enfermedades del tronco son la disminución en la productividad de la planta, la muerte de los brazos, el fallo en los injertos, la muerte de los brotes y cordones, síntomas foliares como clorosis y necrosis, podredumbre blanca del tronco, decoloración de la madera, necrosis con coloración oscura en forma de cuña en el tronco y el deterioro progresivo (Aroca *et al.*, 2007).

Hongos traqueomicóticos involucrados en la Esca

En 1912, Lionello Petri reportó haber aislado hongos pertenecientes al género *Acremonium* y *Cephalosporium* de madera con puntos negros necróticos proveniente de viñas con síntomas de deterioro progresivo al igual que de viñas que presentaban síntomas de Esca. Tras la inoculación de estos hongos en plantas de vid sanas, se pudieron reproducir los puntos necróticos en la madera (Crous y Gams, 2000). Posteriormente, basándose en las descripciones de Petri, estos hongos fueron nombrados *Phaeoacremonium chlamydosporum* y *P. aleophilum* respectivamente, dos especies nuevas descritas por Crous *et al.* (2000, 1996). En 1959 Chiarappa aisló una especie la cual identificó como *Cephalosporium* a partir de viñas con puntos de color marrón en los frutos, y también demostró que este hongo producía decoloración en la madera. Un hongo similar, *Phialophora parasitica*, fue reportado por Ajello *et al.* (1974), como una nueva especie la cual fue aislada de un paciente que presentaba una micosis subcutánea en el hospital de la Universidad de Stanford, C.A, EUA.

El estudio de más aislados provenientes de vid, así como de otros huéspedes, demostró que estos representaban un grupo natural bien definido diferente a *Phialophora*. Estos aislados se diferenciaban de *Phialophora* en la morfología del conidióforo y de su collarillo, parecido a una forma pigmentada de *Acremonium*, de ahí el nombre *Phaeoacremonium*. La separación de *Phaeoacremonium* de *Phialophora* (*Herpotrichiellaceae*) también fue apoyada por datos moleculares publicados por Yan *et al.* (1995). En un estudio filogenético, Dupont *et al.* (1998) presentaron información adicional de secuencias del ITS que apoyaban la separación de *Phaeoacremonium* de los hongos parecidos a *Phialophora*, colocando el género en la familia

Magnaporthaceae. Adicionalmente se demostró que *Phaeoacremonium chlamydosporum* tenía mayor relación con *Phialophora verrucosa* que con *Phaeoacremonium*. Posteriormente Crous *et al.*, (2000) confirmaron lo anterior en un estudio filogenético donde analizaron la mayoría de las cepas de *Phaeoacremonium*, preservadas en el banco de cepas CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos). En este estudio se analizaron dos grupos de secuencias: la región ITS1-5.8s-ITS2, y un fragmento del gen de la β -tubulina, los resultados obtenidos apoyaron y corroboraron los descubrimientos de Dupont *et al.* de 1998 (Crous y Gams 2000).

A partir de las diferencias morfológicas y las diferencias moleculares que se observaron entre *P. chlamydosporum* y otras especies de *Phaeoacremonium*, Crous y Gams (2000) separaron a *P. chlamydosporum* del género, transfiriéndolo con su epíteto específico al género *Phaeomoniella*, en el cual solo se encontraban dos especies más.

El complejo de la Esca

Durante la década de los 20's hasta los finales de los 70's se tenía clasificada a la Esca como un solo padecimiento, pero con base a las observaciones e investigaciones que comenzaron en los años 80's, se modificó el concepto de la enfermedad y de sus causas. Con el conocimiento que se tiene hasta la fecha, se ha clasificado a la Esca como una enfermedad compleja que agrupa los siguientes síndromes: aparición de puntos marrón oscuro en el tejido vascular en esquejes (en Inglés, brown wood streaking of the rooted cuttings), la enfermedad de Petri, la Esca joven, la Esca propiamente dicha y el fenómeno llamado apoplejía. (Surico *et al.*, 2008).

El complejo de la Esca es causado principalmente por *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium inflatipes* (Crous *et al.*, 1996) y *Fomitiporia mediterránea*; que pueden actuar en combinación o en sucesión (Pottinger *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006; Surico *et al.*, 2006).

Puntos marrón oscuro en el tejido vascular en esquejes

El complejo de la Esca puede comenzar cuando se propagan las plantas utilizando esquejes infectados, apareciendo al poco tiempo el primer síndrome: puntos marrón oscuro en el xilema. Este padecimiento es causado por *Phaeomoniella chlamydospora* y no se presentan síntomas externos. Si se realizan cortes longitudinales en los troncos de plantas enfermas se pueden observar varios tipos de deterioro en la madera, si se realizan cortes transversales se pueden observar puntos de color marrón oscuro a negro en el xilema alrededor de la médula formando a veces un anillo o esparcidos por el tronco y una sustancia gomosa de color negro es exudada de los puntos negros conocida como “black goo” (Mugnai *et al.*, 1999).

Enfermedad de Petri

La enfermedad de Petri puede surgir *de novo* o de la evolución de los puntos negros en el xilema (Morton, 1995; Scheck *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Mugnai, *et al.*, 1999; Pascoe y Cottral, 2000). Esta se presenta principalmente en plantas muy jóvenes (de alrededor de 1 año) cultivadas en vivero, por lo que puede afectar al establecimiento de viñedos nuevos y ocasionar pérdidas económicas. Se manifiesta con síntomas foliares (clorosis moderada), injertos fallidos, poco crecimiento, muerte de los brotes, deterioro progresivo y hasta la muerte de la planta. Internamente la enfermedad se

manifiesta por la aparición de puntos color marrón oscuro a negro en el xilema que son observables cuando se realiza un corte transversal en los troncos o tallos (Edwards y Pascoe, 2004).

Esca joven

La Esca joven (en inglés, Young Esca) se presenta en plantas de entre 2 y 7 años, externamente se pueden observar síntomas foliares, como necrosis con un patrón “atigrado” el cual es típico de Esca, internamente se presentan los puntos negros ya antes mencionados, colonizados por *P. chlamydospora* y algunas veces *Phaeoacremonium* spp. La aparición de puntos con una coloración púrpura tenue es común en las variedades que producen uva de mesa (Surico et al., 2008). La enfermedad de Petri y la Esca son dos de las enfermedades más destructivas de la vid (Larignon y Dubos, 1997; Gubler et al., 2004; Santos et al., 2006).

Esca propiamente dicha

La Esca propiamente dicha se presenta principalmente en plantas maduras, disminuyendo su producción y longevidad (Gubler et al., 2004; Pottinger et al., 2002; Ascunia et al., 2004; Surico et al., 2008) y es conocida en todos los lugares donde se cultiva vid (Mugnai et al., 1999). Existen reportes de padecimientos parecidos a Esca en escritos antiguos griegos y romanos por lo que es factible que la enfermedad sea tan antigua como el cultivo (Mugnai et al., 1999). Los síntomas típicos de esta enfermedad son la superposición de todos los síntomas anteriores, aunado a la podredumbre blanca (causado por *Fomitiporia* sp.), que gradualmente vuelve al tronco una esponja quebradiza. En esta como en las otras enfermedades que fueron descritas, pueden presentarse otros tipos de necrosis, causados por otros hongos endófitos patógenos, tales

como especies de *Botryosphaeria*, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola*, etc. La ocurrencia de estos patógenos y su incidencia dependen de la existencia de una fuente de inóculo particular en el área (Surico *et al.*, 2008).

Apoplejía

Las plantas afectadas por apoplejía (tradicionalmente considerada la forma severa de la Esca) muestran decaimiento repentino en la corona (follaje). Algunas veces esas plantas retoman su crecimiento en la misma o en la el temporada siguiente; a pesar de eso es más común que la planta muera. Las causas de la apoplejía son desconocidas, sin embargo se ha observado que lluvias fuertes seguidas de vientos cálidos a mediados del verano favorecen su aparición (Surico *et al.*, 2008). La razón de ello puede ser que después de una lluvia fuerte, la planta abre sus estomas para eliminar el exceso de agua y si se presentan condiciones de viento con una temperatura elevada, esta debería de cerrar sus estomas para ajustarse a la nueva situación, pero si todavía percibe el agua en el suelo, puede que la señal necesaria no se transmita para que se detenga la pérdida de agua por evapotranspiración, lo cual lleva a un decaimiento rápido de la planta que es característico de la apoplejía (Surico *et al.*, 2008). Se ha observado que los episodios de apoplejía ocurren frecuentemente en temporadas donde no llueve o no ha llovido y que la apoplejía ocurre principalmente en viñas adultas que exhiben pudrición extensiva. A pesar de que la apoplejía está sumamente relacionada con la podredumbre blanca, y que probablemente está relacionada con la destrucción del tejido vascular de la planta, como ésta ocurre en plantas que casi siempre presentan traqueomicosis, no se puede ignorar que puede estar siendo favorecida por la actividad de *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp., quizás por la producción y acumulación de fitotoxinas (exopolisacaridos, scytalona, isoclerona, etc) en las hojas (Surico *et al.*, 2008).

Estudios en California, Francia, Australia y Sudáfrica, han demostrado que los propágulos de *Phaeomoniella chlamydospora* y varias especies de *Phaeacremonium* pueden encontrarse en el tronco, cañas y frutos de la planta, e incluso en los zarcillos que se quedan en los alambres (Surico *et al.*, 2008).

En California se descubrió que las esporas de *Phaeomoniella chalydospora* se dispersan mayormente desde Octubre-Noviembre hasta Abril, y algunas veces en otros meses, siempre y cuando ocurran eventos de lluvia. En Francia, por otro lado, las esporas de *Phaeomoniella chlamydospora* fueron colectadas durante todo el año, incluso durante el invierno, y la dispersión óptima tanto como la infección de las heridas de poda sucedió en periodos donde la temperatura promedio era de 7-15 °C y un máximo de 12-18 °C, cuando ya había ocurrido un evento de lluvia. En Francia, *Phaeoacremonium aleophilum*, no parece infectar heridas de poda ya que sus esporas nunca son capturadas en invierno sino desde comienzos de marzo hasta el primer tercio de abril, o más comúnmente desde mediados de mayo hasta mediados de junio, dependiendo el clima del año (Surico *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que las heridas de podas muestran receptividad hacia la infección, y esta tiende a durar más cuando la poda se realiza en invierno (Diciembre y Enero). Nada se sabe de la fuente de inóculo de *Fomitiporia* en ninguna parte del mundo. Sus cuerpos fructíferos se forman casi exclusivamente en plantas muy viejas. Por lo tanto, se cree que el inóculo llega al viñedo a partir de una fuente externa: viñedos viejos cercanos, o carpóforos que han crecido en otros huéspedes (olivo, kiwi, roble, etc.). Dentro del viñedo, parece ser que *Fomitiporia* no se esparce fácilmente de viña a viña a lo largo de las filas aunque es posible, y tampoco parece transmitirse por medio de las

herramientas de poda (Surico *et al.*, 2008).

Rutas de infección

Para poder explicar la etiología del decline de las viñas jóvenes, varios investigadores dirigieron su atención hacia el material de propagación y a los hongos traqueomicóticos de la Esca. En los primeros trabajos se estudió el material de propagación, y como éste era preparado en los viveros, posteriormente fueron estudiadas las plantas a partir de las cuales se obtenía el material de propagación (Surico *et al.*, 2008). Inicialmente, en Italia se descubrió que los esquejes listos para plantarse, algunas veces poseían decoloración en la madera que podía extenderse por todo el tallo, o se concentraba en el pie del esqueje, o cerca de la zona de injerto, y que estaba colonizado por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophyllum* (Gramaje *et al.* 2008). Subsecuentemente, se descubrió que algunas de las prácticas culturales en muchos viveros no eran adecuadas y que esto podría permitir que estos dos hongos se establecieran (Surico *et al.*, 2008). Después se descubrió que *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophyllum* podían estar presentes en el material de propagación obtenido de la planta madre conocidos como esquejes y que por lo tanto estos eran el reservorio principal del patógeno (Gramaje *et al.* 2008).

Los descubrimientos antes mencionados no fueron sorprendentes, ya que desde que los hongos colonizan los vasos del tejido conductivo, estos pueden ser transportados hacia otras partes de la planta por el flujo de savia. Cuando se cuenta con material de propagación sano y se implementan prácticas culturales adecuadas, se puede llegar a la obtención de esquejes sanos. Sí

esto ocurre, las primeras infecciones que podrían presentarse ocurrirán a través de heridas, especialmente las causadas por heridas ocasionadas por la conducción de la planta, la poda de invierno, la remoción de las yemas laterales y la cosecha mecánica. A pesar de que se han implementado medidas preventivas para el tratamiento de Esca y enfermedad de Petri, ninguna ha resultado totalmente exitosa (Ascunia *et al.*, 2004; Di Marco *et al.*, 2004; Gramaje *et al.*, 2008).

Edad del viñedo y expresión de síntomas

Una vieja creencia acerca de la Esca es que esta se esparce más fácilmente en viñedos viejos. Esto se considera todavía cierto: la incidencia de Esca incrementa con la edad del viñedo y eventualmente los niveles de Esca que se manifiesta (plantas enfermas que presentan síntomas foliares) y la Esca latente (plantas enfermas que permanecen asintomáticas durante un año) pueden exceder un 70-80%. En décadas pasadas se pensaba que niveles altos de Esca solo se presentaban en viñedos de 25 a 35 años de edad, pero se pueden encontrar niveles tan altos en viñedos mucho más jóvenes. Por ende, la enfermedad comienza más temprano en los viñedos, y se alcanza una incidencia mayor en menor tiempo (Surico *et al.*, 2006).

El establecimiento temprano de la Esca ha sido o puede ser atribuido a la producción de material de propagación infectado en los viveros, y/o a la ocurrencia de cantidades mayores de inoculo en la naturaleza lo cual incrementa la probabilidad de infección inicial, en los viveros y durante los primeros años de la vida del viñedo (Surico *et al.*, 2008).

El papel de las toxinas en el desarrollo de los síntomas foliares

Las razones de la aparición de los síntomas foliares en plantas infectadas con Esca y por qué estos síntomas no siempre aparecen por una o más temporadas consecutivas son todavía inciertas. Mugnai *et al.*, (1999) sugirió que los síntomas foliares podrían ser ocasionados por sustancias que se forman en la madera degradada y eran translocadas a las hojas por el flujo de savia. Estas sustancias podrían ser compuestos producidos por el tejido de la planta que reacciona a la invasión, o podrían ser metabolitos tóxicos secretados por los hongos que ocasionan la Esca (Sparapano *et al.*, 1998; Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000). Síntomas foliares similares a los de la Esca fueron reproducidos en tallos, y hojas de vid, cuando estos absorbieron filtrados de cultivos de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*, o varias toxinas extraídas de los extractos: pululanos, isoclerona, scytalona y otras naftalenonas (Surico *et al.*, 2006). Para explicar la formación de los síntomas foliares se han formulado otras hipótesis. Por ejemplo, se ha postulado que los síntomas externos de Esca podrían estar relacionados con la cavitación. Este fenómeno ocurre cuando el xilema se llena de aire y deja de cumplir su función. Se cree que la cavitación ocurre como resultado del estrés hídrico, o en puntos precisos donde la planta presenta una herida: donde la rama es doblada y herida por el tipo de conducción; esto ocasiona que el flujo de savia se vea interrumpido por la cicatrización debida a la herida (Lecontome *et al.*, 2005). Es muy probable que las interrupciones en el flujo del agua provoquen el marchitamiento de las hojas y estén involucrados en la apoplejía. Se ha observado que la aparición de síntomas foliares es favorecido por eventos de lluvia, especialmente en estadios particulares de desarrollo de la planta, pero se desconoce exactamente cómo es que la lluvia actúa en el desarrollo de síntomas (Surico *et al.*, 2006).

Características microscópicas de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* sp.

Phaeomoniella chlamydospora

El género *Phaeomoniella* comprende tres especies: *P. zymoides*, *P. pinifoliorum* y *P. chlamydospora*. Esta última es común en todas las regiones donde se cultiva vid y su forma sexual no es conocida. *Phaeomoniella chlamydospora* es un ascomiceto perteneciente a la familia *Herpotrichiellaceae*. Posee micelio septado y ramificado, sus hifas de 2-4 μm de grosor y se pueden encontrar solas o en haces de hasta 10, poseen tubérculos, su pared es de una coloración verde-marrón y los septos poseen mayor pigmentación, siendo las hifas más claras hacia la región conidiógena. Presenta estructuras parecidas a clamidosporas las cuales son globosas a subglobosas, mayormente solitarias, de color oliváceo a verde-marrón tenue, son tuberculadas, con un tamaño de 7-15 μm de largo por 5-17 μm de diámetro. Sus conidióforos son monofialidicos, la célula apical es elongada-ampuliforme, la base posee una coloración verde-marrón, tornándose más clara hacia la punta, y puede presentar de 1 a 3 septos. La célula conidiógena es solitaria y terminal, con una coloración verde tenue a subhialina. Los conidios son subhialinos, oblongados-elipsoidales a obovados (Crous y Gams, 2000).

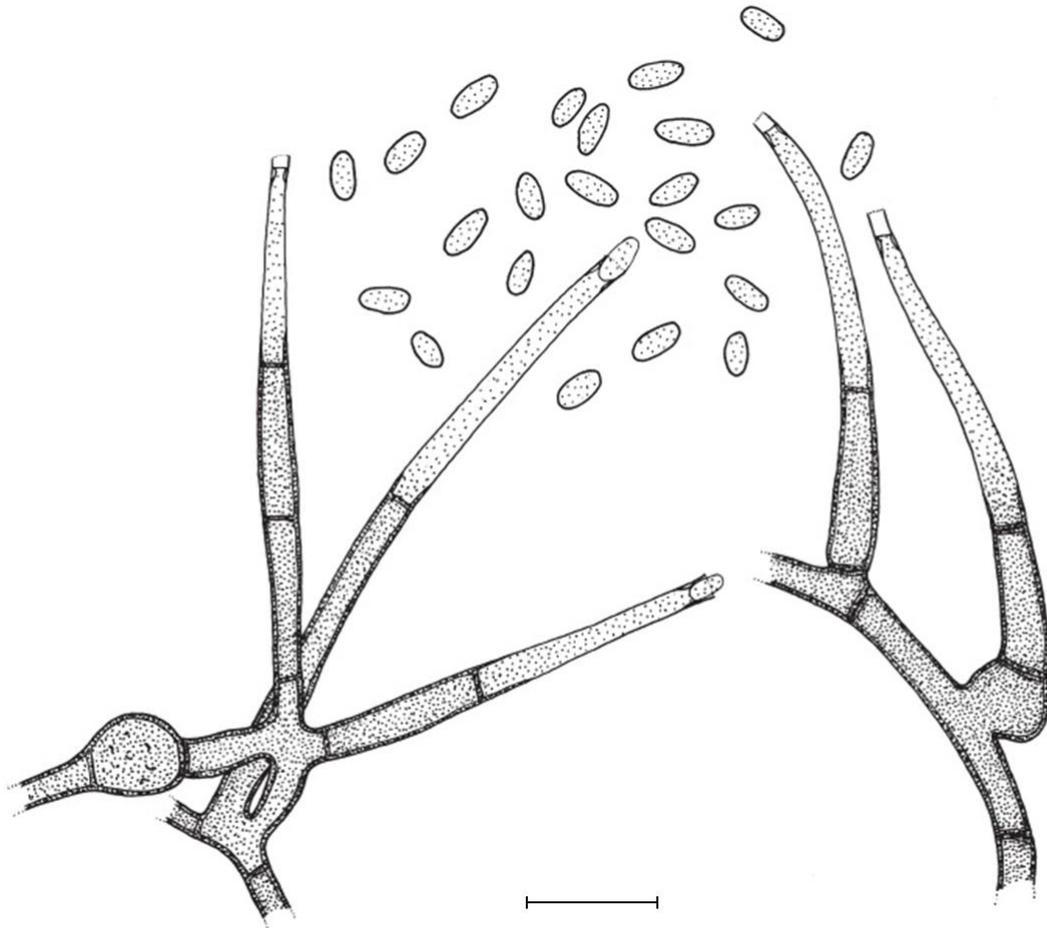


Figura 1. Conidióforos y conidios de *Phaeoconiella chlamydospora*. Barra = 10 μm . Tomado de Crous y Gams (2000).

***Phaeoacremonium* spp.**

El género *Phaeoacremonium* engloba 21 especies con un amplio rango de hospederos, de las cuales 13 han sido aisladas de vid (Tabla I). La caracterización por microscopia de las especies de este género siempre se acompaña de estudios moleculares utilizando ya sea un fragmento del gen de la β -tubulina, un fragmento del gen de la actina y la secuencia ITS1-5.8S-ITS2.

Tabla I. Lista de especies de *Phaeoacremonium* aisladas asociadas al complejo de la Esca y su país de origen. (Modificado de Mostert *et al.*, 2006.)

Especie	Países
<i>P. aleophilum</i>	Argentina, Australia, Austria, Chile, Irán, Italia, Francia Sudáfrica, España, Turquía, EUA, Yugoslavia
<i>P. angustius</i>	Portugal, EUA
<i>P. australiense</i>	Australia
<i>P. austroafricanum</i>	Sudáfrica
<i>P. inflatipes</i>	Chile
<i>P. iraniarum</i>	Irán
<i>P. krajdinii</i>	Sudáfrica
<i>P. mortaniae</i>	EUA
<i>P. parasiticum</i>	Argentina, Australia, Chile, Irán, Sudáfrica, EUA
<i>P. scolyti</i>	Republica checa, Francia, Sudáfrica
<i>P. subulatum</i>	Sudáfrica
<i>P. viticola</i>	Irán, Francia, Sudáfrica, EUA
<i>P. venezuelense</i>	Sudáfrica

El micelio de los integrantes del género *Phaeoacremonium* consiste en hifas septadas y ramificadas que pueden encontrarse solitarias o en haces de 4-27. El color del micelio varía, hay especies relativamente pálidas y otras con una coloración marrón oscura, pero en general las hifas tienen una pigmentación marrón, la cual se torna más clara hacia el área donde se forman los conidios. Las hifas normalmente presentan gotitas de exudado que se observan como tubérculos bajo el microscopio, y las cuales varían de densidad y tamaño dependiendo la especie. *Phaeoacremonium parasiticum*, por ejemplo, tiene tubérculos prominentes, por lo que puede ser fácilmente identificado. Los conidióforos son estructuras muy importantes para la distinción entre especies del género. Debido a las diferencias morfológicas en los conidióforos se pueden distinguir especies con conidióforos predominantemente largos (*P. parasiticum*)

o frecuentemente ramificados (*P. inflatipes*, *P. sphinctrophorum*) de especies con conidióforos cortos y raramente ramificados o sin ramificaciones (*P. aleophilum*) (Mostert *et al.*, 2006).

Se han identificado 3 tipos de fiálides en el micelio aéreo de *Phaeocremonium*, los tipos I-III. Las fiálides difieren en tamaño y forma. El tipo I es conocido como adenofialide, son las más cortas, (3-11 μm), y no presentan septo basal. Las del tipo II son de tamaño mediano (9-14 μm), y son elongadas ampuliformes o naviculares. El tipo III es el más largo, (15-23 μm), y poseen una forma subcilíndrica, navicular o subulata. Los conidios tienen una forma oblongada-elipsoidal a alantoidal, y tienden a agregarse en cúmulos esferoidales en la región conidiógena de la fiálide y miden entre 3-5 μm de largo (Mostert *et al.*, 2006).

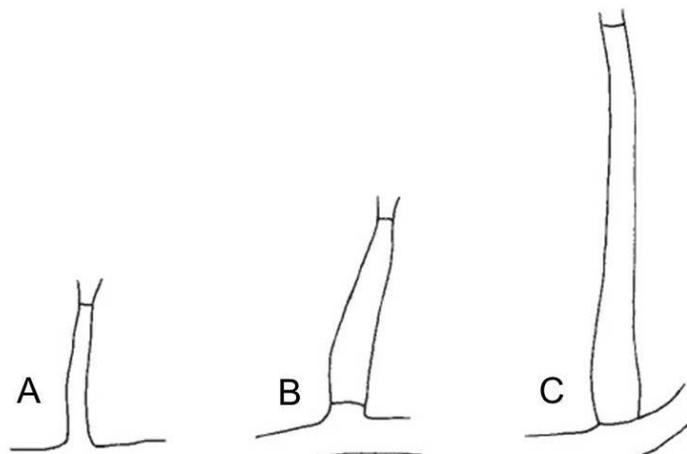


Figura 2. Tipos de fiálide que presenta el género *Phaeocremonium*. A) I, B) II, C) III. Tomado de Mostert *et al.*, 2006.

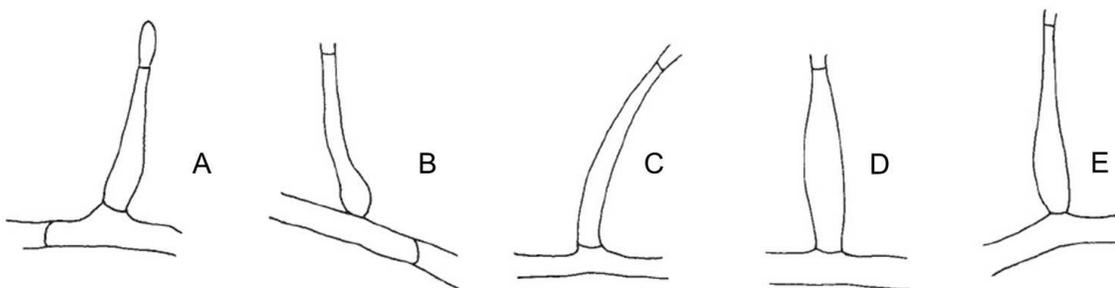


Figura 3. Distintas formas del tipo de fiálide III, que presenta el género *Phaeoacremonium*. Tomado de Mostert et al., 2006.

Aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de especies

Dado que la identificación morfológica no es suficiente para diferenciar a las especies de *Phaeoacremonium*, la aplicación de técnicas moleculares es esencial para lograr esta labor, en cuanto a *Phaeomoniella chlamydospora*, su identificación por medio de microscopía posee un grado de dificultad menor ya que solo una especie del género se ha reportado como patógena en vid.

Los trabajos más relevantes donde se caracterizaron a los patógenos del Complejo de la Esca utilizando herramientas moleculares son los siguientes:

Overton y colaboradores (2004) utilizaron PCR (del Inglés Polymerase Chain Reaction) tiempo real con SYBR green para determinar el agente causal del deterioro de la vid en el estado de Pensilvania y Nueva York en EUA, diseñando los cebadores Pmo1f/Pmo2r y Pac1f/Pac2r para la identificación de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. respectivamente. Los

resultados mostraron que los hongos causantes de la enfermedad de Petri están asociados con plantas maduras, al deterioro progresivo y con injertos recientemente plantados.

Mostert y colaboradores (2006) publicaron un trabajo donde se estudió la taxonomía de *Togninia* y sus anamorfos *Phaeoacremonium*. Este trabajo cuenta con una clave dicotómica, ilustraciones, fotografías y descripciones de las distintas especies para poder diferenciar entre ellas.

Aroca y Raposo (2007), diseñaron los cebadores Pm1, Pm2 para la amplificación de la región ITS1 e ITS2, respectivamente de *Phaeoacremonium* spp., obteniendo un fragmento de alrededor de 415 pares de bases (pdb) para nueve especies. Utilizando la técnica de PCR anidado usando los cebadores ITS1/ITS4 en la reacción primaria se logró la detección de *Phaeoacremonium* directamente de madera. La identificación de las especies de *Phaeoacremonium* se logró por la digestión del producto de PCR con las enzimas de restricción BssKI, EcoO109I y HhaI. La distinción de las especies fue posible por el patrón de restricción, excepto para *P. angustius* y *P. viticola*, las cuales tuvieron una similitud en la secuencia ITS del 100%, por lo que la amplificación de un fragmento del gen de la β -tubulina fue necesario para diferenciarlas. Como resultado desarrollaron un protocolo rápido para diferenciar especies de *Phaeoacremonium* en unas cuantas horas.

Aroca y colaboradores (2008) utilizaron la técnica de PCR de tiempo real para identificar y diferenciar varias especies de *Phaeoacremonium* a partir de ADN extraído de plantas enfermas, utilizando cebadores degenerados que amplificaron un fragmento del gen de la β -tubulina. El método de PCR tiempo real detectó exitosamente *Phaeoacremonium* en todos los trozos de madera

analizados, e incluso la presencia de dos especies distintas en un mismo trozo de madera.

Cobos y Martin (2008) identificaron cepas de *Phaeomoniella chlamydospora* a partir de métodos convencionales y corroboraron su identidad por la secuenciación del ITS, un fragmento del extremo 5' del gen de la β -tubulina y la secuencia parcial del factor de elongación 1- α utilizando los cebadores ITS4/ITS5, T1/BT-2b y EF1-728F/EF1-986R respectivamente. También realizaron RAPD's a partir de ADN extraído de cultivos monoespóricos, compararon los patrones de bandeo y observaron que *P. chlamydospora* presentó una considerable homogeneidad genética.

Essakhi y colaboradores (2008) caracterizaron 118 cepas de *Phaeoacremonium* aisladas de vid que presentaban síntomas de Esca. Compararon la morfología del conidióforo, el tipo y la forma de la fiálide y el color de las colonias en MEA y PDA. Realizaron un análisis filogenético con alineamientos concatenados con las secuencias de los genes de B-tubulina y de Actina, utilizando los sets de cebadores T1/Bt2 y ACT-512F/ACT-783-R respectivamente. Sus resultados mostraron las diferencias entre 4 nuevas especies muy parecidas morfológicamente, las cuales solo se pudieron delimitar utilizando los análisis de secuencias de ADN.

JUSTIFICACIÓN

Algunos de los hongos más importantes causantes de enfermedades de la madera son los hifomicetes pertenecientes a los géneros de *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella*. Ambos se encuentran asociados al complejo de la Esca. El signo más característico de la infección por estos hongos es la presencia de puntos necróticos en cortes transversales de la madera y líneas negras a lo largo del xilema en cortes longitudinales. En México no existen reportes de la identidad del o los agentes causantes del Complejo de la Esca (*Vitis vinifera* L.) ni su distribución, al igual que el efecto que estos padecimientos puedan ejercer sobre el rendimiento de la planta, por lo que el aislamiento y caracterización de los patógenos son necesarios para comprender la epidemiología de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Se logrará aislar a *Phaeomoniella chlamydospora* y varias especies de *Phaeoacremonium* sp de viñas con síntomas de decaimiento provenientes de los valles de Guadalupe, Baja California México.

OBJETIVOS

General

Aislar, identificar y caracterizar a los hongos asociados al Complejo de la Esca en la zona vitivinícola del valle de Guadalupe, Ensenada, Baja California, México.

Particulares

Aislar y obtener cultivos puros de los hongos causantes del complejo de la Esca.

Caracterizar morfológicamente los aislados fúngicos obtenidos de vid en la zona vitivinícola del Valle de Guadalupe.

Caracterizar genéticamente los aislados por medio de la secuenciación de fragmentos de algunos de sus genes.

Elucidar la relación filogenética de los aislados regionales con otros reportados en otros países.

Evaluar la patogenicidad de algunos de los aislados por medio de la comprobación de los postulados de Koch.

III

Materiales y Métodos

Muestreo

Los muestreos fueron realizados del 2008 al 2010 en la zona vitivinícola del valle de Guadalupe, San Antonio de la Minas y Santo tomas, en el municipio de Ensenada, Baja California (Figura 4) y fueron dirigidos a plantas con síntomas de decaimiento. En el caso del muestreo del 2010, debido a que ya se había realizado la poda y no fue posible observar síntomas foliares se procedió a muestrear plantas que mostraban la necrosis típica causada por *Phaeomoniella chlamydospora* o *Phaeacremonium* spp. (Puntos de color marrón oscuro en el xilema) en la herida de poda. Las plantas muestreadas fueron fotografiadas y etiquetadas para su posterior identificación, por último se les cortaron trozos de madera de un tamaño aproximado de 15 a 20 cm de los brazos donde se encontraba la herida de poda. Después de cada toma de muestra, las tijeras de podar fueron limpiadas con una solución de hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1.5% (Clorox® al 20% v/v) para prevenir el esparcimiento de cualquier inoculo entre plantas. Los trozos de madera fueron introducidos en bolsas plásticas resellables (Ziploc®) con capacidad para un galón, colocados en una hielera y transportados al laboratorio donde se almacenaron en un refrigerador (SAMSUNG®, COOLTECH Bio®) a 4°C hasta su procesamiento el cual no fue mayor a dos días después.

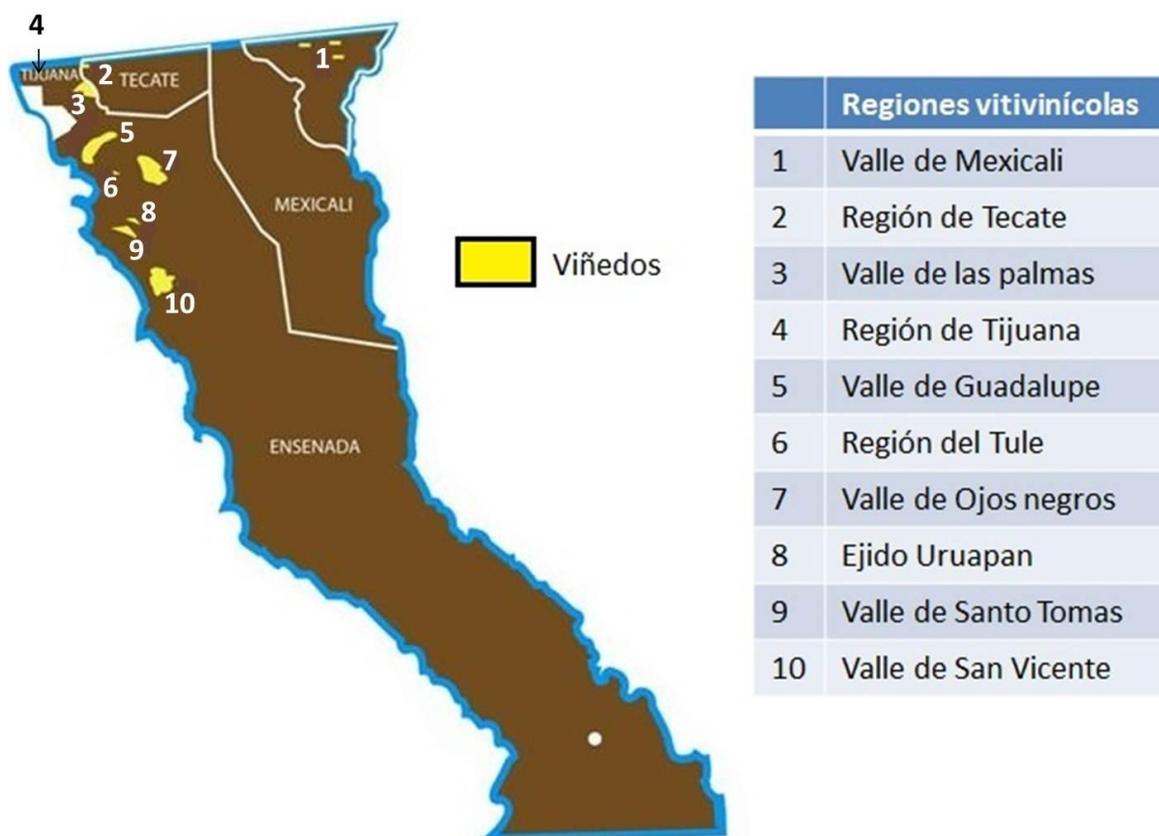


Figura 4. Municipios de Baja California con actividad Vitivinícola.

Aislamiento y mantenimiento de cepas

El aislamiento de hongos a partir de las muestras colectadas en campo se llevó a cabo retirando la corteza de las piezas de madera, lavándolas con jabón bajo el agua corriente y esterilizándolas superficialmente sumergiéndolas en etanol al 95% seguido por un flameado al mechero. Después, las piezas fueron cortadas en trozos más pequeños utilizando tijeras para podar esterilizadas directamente a la flama del mechero. Posteriormente con la ayuda

de una navaja estéril se cortaron rebanadas de 2 a 3 mm de grosor de madera que presentaba necrosis parcial (parte necrótica, parte tejido sano). Cuatro trozos procesados de esta manera se colocaron de forma equidistante en cajas de Petri plásticas de 85 mm que contenían aproximadamente 20 ml de Agar Papa-Dextrosa (PDA DIFCO®) y tetraciclina (25mg/ml) para evitar la proliferación de bacterias. Las cajas permanecieron en oscuridad y a la temperatura del laboratorio que en promedio es de 24 °C. Una vez que se observó crecimiento de lo que se creía podía ser *Phaeomoniella* o *Phaeocremonium*, micelio de estos hongos fue resembrado en cajas Petri plásticas de 85 mm en PDA fresco para obtener cultivos puros. De los cultivos puros obtenidos, se elaboraron cultivos monoespóricos plaqueando diluciones de los cultivos conservados en glicerol a -20°C, después de 3 días una germínula fue resembrada en una caja Petri con PDA. A partir de estos cultivos se realizaron los análisis que se describen más adelante.

Para la conservación de los cultivos puros monoespóricos se cortaron con una espátula micológica estéril, 2 a 3 trozos de micelio (de alrededor de 1 cm²) que contenían conidios y se introdujeron en tubos plásticos estériles de 10 ml que contenían glicerol al 50% y fueron almacenados a -20°C en un ultracongelador (VWR®).

Caracterización morfológica

Para definir la clasificación taxonómica de las cepas aisladas en los muestreos realizados en 2008, 2009 y 2010, se llevó a cabo la observación de la morfología de las fiálides (estructuras reproductivas). A partir de cultivos

monospóricos de 4 semanas cultivados en medio PDA Difco, se realizaron preparaciones temporales utilizando la técnica de bloque invertido, la cual consistió en cortar una pieza del cultivo de forma rectangular o cuadrada que comprendía del margen de la colonia hasta el centro de la misma e invertirlo sobre un cubreobjetos rectangular. Las preparaciones se observaron con las técnicas de campo claro y contraste de fases utilizando el microscopio invertido Axiovert 200 Zeiss®. Las fotografías fueron tomadas con la cámara AxioCam HRc, la cual cuenta con un sensor de 1.4 Mpx y se procesaron con el programa AxioVision ver. 4.7. Los aislados fueron identificadas basándose en las claves taxonómicas de Crous y Gams (2000), Monsert *et al.*, (2006) y Essakhi *et al.*, (2008).

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN, todas las cepas fueron inoculadas en tubos plásticos de 50 ml, que contenían 15 ml de caldo Papa-Dextrosa elaborado en el laboratorio de la siguiente manera: Utilizando 200 gr de papa pelada se realizó una infusión en 700 ml de agua destilada la cual se mantuvo en ebullición por 15 minutos, se agregaron 20 gr de sacarosa y se ajustó el volumen a 1 litro con agua destilada. Los tubos se mantuvieron en agitación constante a 180 rpm a 30°C en un agitador orbital por 15 días. Posteriormente el micelio fue filtrado utilizando una bomba de vacío, acoplada a un matraz Kitasato y un embudo Büchner en el cual se colocó un filtro de papel Watman # 1 de 5.5 cm de diámetro cortado a la medida del embudo. Los filtros que contenía el micelio fueron conservados en un tubo plástico de 2 ml a -20 °C para su posterior procesamiento. Al momento de realizar la extracción de ADN, a los filtros se les agrego 1.8 ml de agua destilada estéril y se colocaron en un

agitador por 30 segundos para desprender el micelio del filtro. El filtro fue retirado y los tubos centrifugados a 1000xg a 4°C por 1 minuto para formar una pastilla de micelio, el cual fue congelado con nitrógeno líquido y macerado utilizando una varilla de vidrio estéril con punta aguzada. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit DNeasy Plant Tissue (Quiagen®) siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia de la extracción fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris-acetato-EDTA (TAE) y 0.5 µl/ml de bromuro de etidio para visualizar el ADN. En cada pozo se colocaron 5 µl de la muestra que contenía ADN y 2 µl de buffer de carga. Un marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen® No. de Catalogo: 15615-016) fue utilizado para corroborar que el peso molecular del ADN extraído correspondiera con el del ADN genómico. La electroforesis se llevó a cabo a 75 voltios por 35 minutos. El gel fue observado con luz UV en un transluminador (Biorad®). Las muestras positivas para la presencia de ADN fueron conservado a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml hasta su utilización.

Amplificación por PCR de fragmentos de los genes factor de elongación de la traducción 1- α , β -tubulina, actina y la región ITS2-5.8S-ITS1.

A partir del ADN extraído de las cepas de *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. aisladas en campo se realizaron las amplificaciones de algunos de sus genes por medio de PCR. La región ITS1-5.8s-ITS2 fue amplificada para todas la cepas. Los fragmentos de los genes de la β -tubulina y EF1- α fueron amplificados para las cepas identificadas por el análisis morfológico como *Phaeoconiella chlamydospora*, mientras que para las cepas

identificadas como *Phaeoacremonium* spp. se amplificaron fragmentos de los genes de la β -tubulina y actina.

El gen del ARN ribosomal 5.8s y las regiones ITS1 e ITS2 que lo flanquean de aproximadamente de 600 pares de bases (pdb), fueron amplificadas utilizando los cebadores ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') e ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') (White *et al*, 1990). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 58°C, 1 minuto de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Un fragmento del extremo 5' del gen de la actina de aproximadamente 200 pdb fue amplificado utilizando los cebadores ACT-512F (5'-ATG-TGC-AAG-GCC-GGT-TTC-GC-3') y ACT-783R (5'-TAC-GAG-TCC-TTC-TGG-CCC-AT-3') (Carbone y Kohn, 1999). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 61°C, 30 segundos de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Un fragmento del extremo 5' del gen de la β -tubulina de aproximadamente 600 pdb fue amplificado utilizando los cebadores T1 (5'-AAC-ATG-CTG-GAG-ATT-GTA-AGT-3') y BT-2b (5'-ACC-CTC-AGT-GTA-GTG-ACC-CTT-GGC-3'). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 56°C, 1 minuto de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Un fragmento del extremo 5' del factor de elongación de la traducción EF1- α de aproximadamente 200 pdb fue amplificado utilizando los cebadores EF1-728F (5'-CAT-CGA-GAA-GTT-CGA-GAA-GG-3') y EF1-986R (5'-TAC-TTG-AAG-GAA-CCC-TTA-CC-3') (Carbone y Kohn, 1999). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 53°C, 30 segundos de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Todas las reacciones contuvieron por muestra 25 μ l del buffer FailSafe 2X PreMix (No. catalogo FSP995E, Epicentre Biotechnologies), 1 μ l de cada cebador a una concentración de 10 μ M, 1 o 2 μ l de ADN, 0.2 μ l de la enzima Taq Polimerasa (No. Catalogo M203D, Promega) y el resto de agua para completar un volumen final de 50 μ l.

Para verificar la presencia de los fragmentos deseados, después de cada amplificación, se tomaron 3 μ l de los productos de PCR y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (Invitrogen®) de 1 Kb se utilizó para verificar el tamaño de las secuencias amplificadas. Los productos de PCR fueron aislados utilizando las columnas Montage® PCR (Millipore®) ó el kit QIAquik® (Quiagen®) para retirar los Desoxinucleotidos trifosfato y la polimerasa. Los fragmentos así obtenidos fueron enviados a la compañía Eton Bioscience Inc. (San Diego, CA) para su secuenciación.

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, se accedió al banco de secuencias (GenBank) de “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se utilizó el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar las secuencias obtenidas a partir de las cepas aisladas de vid con las depositadas previamente en esta base de datos.

Para el análisis de las secuencias, primeramente se obtuvieron secuencias de hongos pertenecientes a ambos géneros aislados de diferentes partes del mundo de la página web del NCBI. Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple usando ClustalX 2.0.11 (Thompson, 1994) usando los parámetros por defecto. El alineamiento se corrigió manualmente usando el programa BioEdit Sequencer Alignment Editor (versión 7.0.9.0; Tom Hall, Isis Pharmaceuticals, Inc, Carlsbad, CA). El análisis filogenético se realizó usando el software computacional MEGA 4 con los algoritmos Neighbor-Joining (el vecino más cercano). La estabilidad de los clados se calculó mediante 500 réplicas de bootstrap (Hillis y Bull, 1993). Los fragmentos se analizaron independientemente de la secuencia amplificada (ITS, β -tubulina, Actina y EF1- α). Por último se cotejaron los resultados de la caracterización morfológica con los resultados de la caracterización molecular para poder definir taxonómicamente cada aislado.

Ensayos de patogenicidad

Evaluando las características coloniales y con los resultados obtenidos de las observaciones microscópicas de las cepas, se obtuvieron 5 grupos de *Phaeomoniella chlamydospora* y 3 de *Phaeoacremonium* spp., 1 aislado de cada grupo fue seleccionado para la evaluación de la patogenicidad mediante la comprobación de los postulados de Koch. Para esto se utilizaron plantas certificadas de vid cv. Cabernet-Sauvignon de alrededor de 1 año de edad procedentes de esquejes.

Las plantas fueron inoculadas de la siguiente manera: Utilizando una navaja de rasurar estéril, se realizaron heridas con forma de muesca en el tronco y en el tejido verde lo suficientemente profundas para exponer el tejido conductivo de la planta, el inóculo consto de un cultivo de 4 días obtenido a partir de una suspensión de conidios crecido en medio de PDA (Difco). Un disco de micelio se colocó dentro de la muesca y se cubrió con Parafilm (Parafilm American Nacional Can) para evitar su deshidratación. En cada planta se realizaron dos o tres inoculaciones, una o dos en tejido verde y otra en el tallo principal. Como control se inocularon plantas con medio PDA de la misma manera. Cada aislado fue inoculado en 5 plantas (5 réplicas por aislado, 45 en total). La evaluación en tejido verde se llevó a cabo 30 días después de la inoculación primero fotografiando las plantas y posteriormente cortando el tejido verde donde se había aplicado el inóculo, se observo si se presentaba o no lesión en el sitio de inoculación y alrededor del mismo y se tomaron las medidas de las heridas producidas por el hongo. Por último se reaislaron los hongos de la misma manera como se aislaron a partir de madera de vid y se compararon con los inoculados.

El inóculo aplicado en el tallo principal se evaluó 3 meses después de iniciado el experimento para permitir que se desarrollara adecuadamente. A falta de un invernadero las plantas permanecieron al aire libre durante el tiempo que duró el experimento. Como parte final del ensayo se reaislaron los hongos y se compararon con los inóculados.

IV

Resultados y Discusión

Muestreo

Los muestreos realizados del 2008 al 2010 en diferentes viñedos del valle de Guadalupe, San Antonio de las Minas y Santo Tomás en BC, permitieron observar las condiciones en la que se encontraban las plantas. La mayoría de las plantas en los viñedos se mostraban aparentemente sanas a simple vista, aunque realizando una observación más detallada de la herida de poda se lograron observar heridas manifestadas en forma de puntos concéntricos de color marrón oscuro en el xilema y decoloración de la madera. El total de muestras colectadas de diferentes cultivares de vid (Merlot, Misión, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Syrah) durante los 3 años de muestreo fue alrededor de 200 de las cuales de 23 muestras se lograron aislar hongos morfológicamente similares a *Phaeomoniella* spp. y *Phaeoacremonium* spp. Otros síntomas que se presentaron en campo fueron: marchitamiento del follaje, necrosis en la periferia de las hojas, menor cantidad de hojas y menor talla a comparación con las plantas sanas. No se observó el patrón de necrosis “atigrado” en las hojas, el cual es típico de la Esca.

Las lesiones presentadas en las muestras fueron decoloración de la madera, necrosis en forma de cuña y puntos concéntricos de color marrón oscuro los cuales se extendían longitudinalmente por la madera. En ninguno de los casos se observaron pudriciones. Los aislados putativos de *Phaeomoniella* spp. ó *Phaeoacremonium* spp. fueron aisladas de las muestras que

presentaban necrosis en forma de puntos.

Se seleccionaron 14 aislados debido a su tasa de crecimiento muy baja (menor a 1 mm/día), micelio denso que en un principio era blanco y con el tiempo se tornó verde claro a verde olivo los cuales se asumió que pertenecían a la especie *Phaeomoniella chlamydospora*, y 9 que presentaban micelio algodonoso de coloración marrón claro y que pigmentaban el medio de cultivo de color amarillo, los cuales se asumió que correspondían al género *Phaeoacremonium* (Tabla II). Otros endofitos aislados fueron: *Botryosphaeria* spp, *Cylindrocarpon* spp. y *Trichoderma* spp.

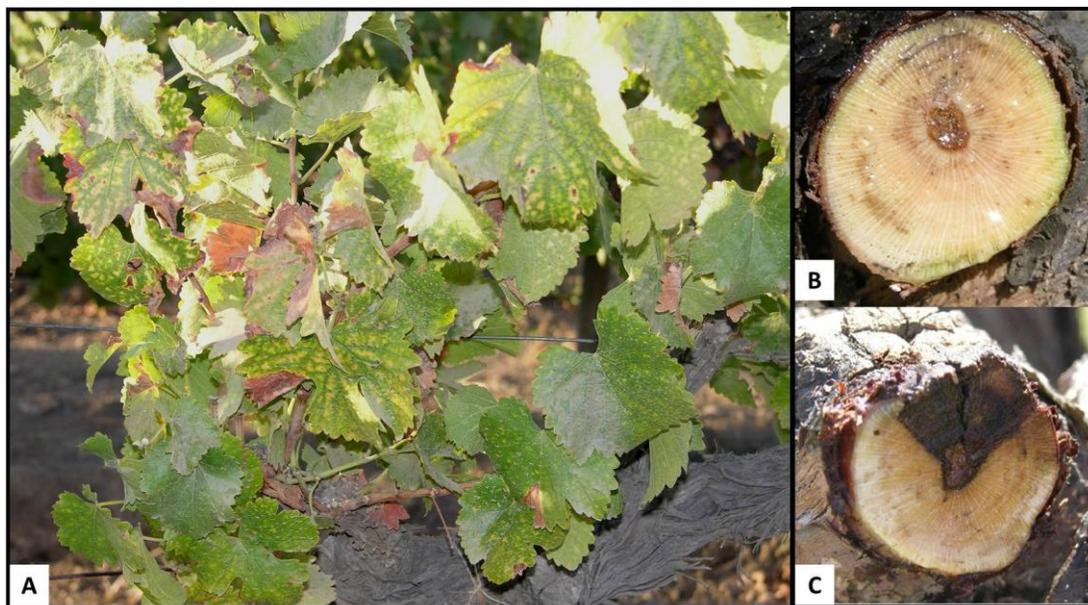


Figura 5. A) Viña con síntomas foliares observada en el valle de Guadalupe. B y C) Signos en herida de poda observados en algunas plantas de vid: Puntos concéntricos de color marrón y cancro en forma de cuña, respectivamente.

Los síntomas presentados por la plantas en campo fueron los mismos descritos en otras regiones vitivinícolas del mundo como Italia (Graniti *et al.*, 2000) California, EUA (Rooney-Latman *et al.*, 2005), Francia (Mugnai *et al.*,

1999) entre otros. No se observó el típico patrón “atigrado” de necrosis y clorosis foliar el cual es típico de la Esca y ha estado ligado a la enfermedad desde principios del siglo XX (Surico, 2006), pero si se observaron síntomas parecido a las primeras etapas de este.

Tabla II. Aislados identificados como *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* sp. obtenidos durante los muestreos 2008-2010.

Aislado	Especie	Sito de aislamiento
CC40-2	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Château Camou
CC42-2	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Château Camou
L501	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Rancho Los cinco de Camilo Magoni
L506	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Rancho Los cinco de Camilo Magoni
L509	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Rancho Los cinco de Camilo Magoni
ME05	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Château Camou
N32	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Norte 32
R09	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Château Camou
SA32	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	San Antonio de las minas
STCSBM7-2	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Santo Tomás
STCSBM7-10	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Santo Tomás
STCSBM10-2	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Santo Tomás
STCSBM13-1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Santo Tomás
STCSBM13-2	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Santo Tomás
BY02-3	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Rancho Bibayoff
BY05	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Rancho Bibayoff
CT01	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Chetto san Antonio de las minas camino a San Marcos plantas de temporal
CT02-1	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Chetto san Antonio de las minas camino a San Marcos vid de temporal
CT06	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Chetto san Antonio de las minas camino a San Marcos vid de temporal
ME01	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Château Camou
STCSBM14-2	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Santo Tomás
Temp02	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Chetto Valle de Guadalupe vid de temporal
Temp02-2	<i>Phaeoacremonium</i> sp	Chetto Valle de Guadalupe vid de temporal

Se ha demostrado que la aparición de síntomas foliares está relacionada directamente a la producción de moléculas polifenolicas llamadas pentacetidos como la scytalona y la isosclerona, así como varios tipos de exopolisacaridos llamados pululanos. Para lograr esto Bruno y colaboradores (2007) extrajeron

de la savia y hojas de viñas sintomáticas así como del medio de cultivo líquido donde se estuvieron creciendo *P. chalydospora*, *Togninia minima* y *Fomitiporia mediterránea* las moléculas antes mencionadas, en el ensayo utilizaron hojas desprendidas de viñas sanas las cuales absorbieron el extracto por medio del peciolo el resultado fueron la producción de síntomas foliares parecidos a los de la Esca.

La explicación de por qué no se ha observado el patrón de necrosis típico de Esca en nuestra región podría ser que los aislados locales de *Phaeomoniella chalydospora* y *Phaeacremonium* spp. no produzcan toxinas en la misma concentración, por lo que la concentración bioactiva de estas se alcanza en mayor tiempo (Bruno *et al.*, 2007) y la aparición de síntomas foliares solo se puede observar en un lapso de tiempo mayor o también que el nivel de infección es menor, refiriéndose a la extensión del hongo en la planta; lo cual podría ocasionar que la producción de toxinas disminuya y los síntomas foliares no sean tan severos en comparación con las plantas que presentan el patrón típico de necrosis, o que algún factor abiótico influya sobre el hongo ocasionando una menor producción de toxinas.

En lo que respecta al aislamiento de hongos, los resultados de este trabajo concuerdan con los reportes publicados por varios autores: Aroca *et al.*, 2006; Giménez *et al.*, 2006; Edwards y Pascoe 2004; Edwards *et al.*, 2007; Larignon y Dubos, 1997; Calzarano y Marco, 1997; Gubler *et al.*, 2004, Rooney-Latman *et al.*, 2005 y Krol 2006, donde se han aislado varias especies pertenecientes al género *Phaeacremonium*, principalmente *P. aleophilum* y *Phaeomoniella chalydospora* a partir de injertos y viñas que presentaban síntomas de Esca, así como otros hongos patógenos como *Cylindrocarpon* spp. y *Botryosphaeria* spp. y endófitos como *Trichoderma* spp. El hecho de solo

haber encontrado una especie de *Phaeoacremonium* podría ser explicado al tamaño del muestreo ya que realizando uno más extenso se podrían encontrar otras especies de *Phaeoacremonium*, ya que *P. aleophilum* es la más abundante (Aroca *et al.*, 2006; Calzarano y Di Marco, 2007; Edwards y Pascoe, 2004; Edwards *et al.*, 2007; Giménez *et al.*, 2006; Gubler *et al.*, 2004; Krol, 2006; Larignon y Dubos, 1997). El hecho de no haber aislado *Fomitiporia* spp., se puede deber a que este solo está presente en viñedos viejos o con casos avanzados de Esca (Fischer, 2002), por lo que se tendría que realizar un muestreo a viñedos con esas características.

Caracterización morfológica de los aislados

Caracterización de aislados putativos de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Las colonias de los aislados seleccionados como *Phaeomoniella chlamydospora* presentaron las mismas características: micelio compacto, blanco, y con una tasa de crecimiento muy baja. La única diferencia entre los 14 aislados fueron las tonalidades de verde que presentaron, las cuales iban de un verde muy claro a un verde muy oscuro como se observa en la Figura 6. Todos los aislados comenzaron como colonias de color blanco con brillo ceroso las cuales se tornaron de color verde con el paso del tiempo, lo cual corresponde a la maduración de las hifas.

Microscópicamente todos los aislados concordaron con la descripción de *P. chlamydospora* publicada por Crous y Gams (2000): colonias compactas que presentan varias tonalidades de verde, micelio aéreo que donde los conidios se acumulan en masas esferoidales sobre las células conidiógenas, presencia de estructuras parecidas a clamidosporas, hifas con una coloración verde olivácea,

conidióforos monofialídicos con 1 a 3 septos, células conidiógenas elongadas con coloración verde tenue a hialina y conidios oblongados-elipsoidales con una coloración similar a la de las células conidiógenas (Figura 7).

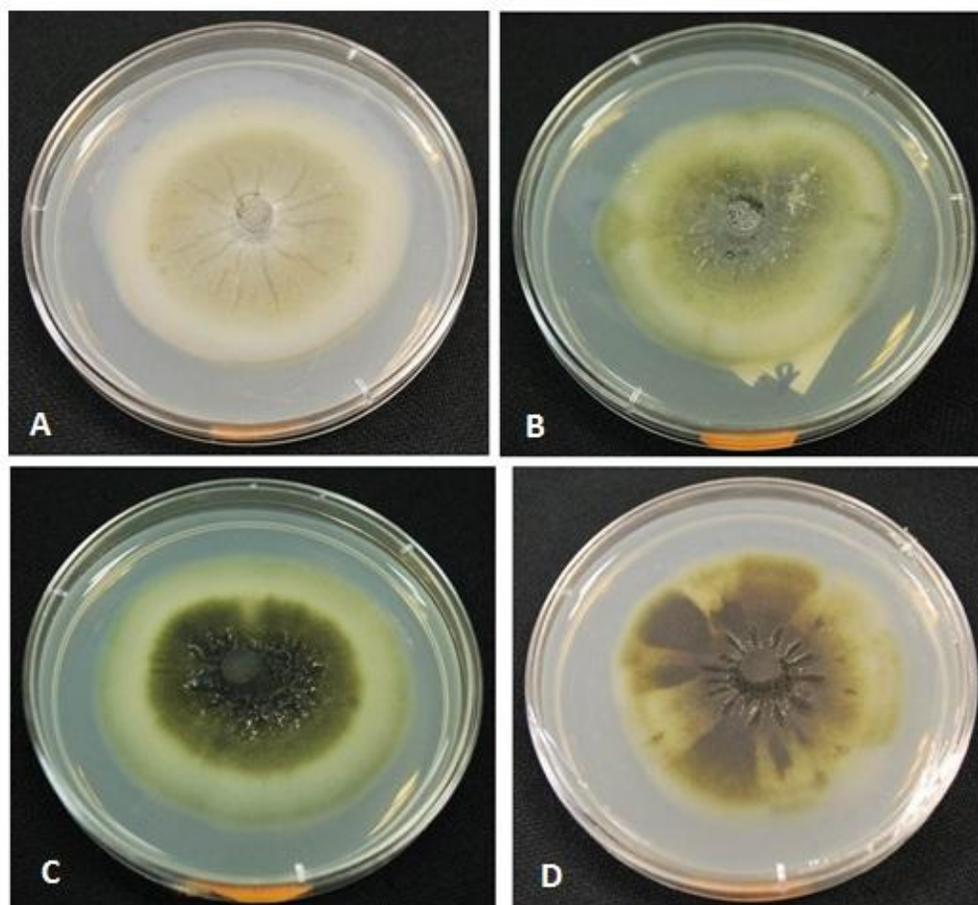


Figura 6. Ejemplos de la coloración que presentaron los aislados de *P. chlamydospora*, en medio PDA, después de 4 semanas de incubación a 25°C A) STCSBM10-2, B) CC42-2, C) STCSBM7-2, D) R09.

El hecho que todos los aislados fueran prácticamente idénticos microscópicamente a pesar de las diferencias en coloración de las colonias era de esperarse ya que de *Phaeoconiella chlamydospora* solo se conoce su

reproducción asexual, por lo que la variabilidad genética de la especie es muy baja y los aislados son fenotípicamente muy parecidos o idénticos. La hipótesis formulada por Tegli (2000), argumenta que la forma de reproducción de *P. chlamydospora* es casi en su mayoría asexual, basándose en la existencia de una distancia genética pequeña entre los distintos genotipos identificados dentro de los dendrogramas generados a partir de secuencias obtenidas por la técnica polimorfismo amplificado de la longitud del fragmento (AFLP, por sus siglas en inglés), lo cual es una prueba de una baja variabilidad genética. Otro estudio que apoya esta teoría es que Pottinger y colaboradores (2002) quienes utilizando varias técnicas moleculares en aislados neozelandeses de *Phaeomoniella chlamydospora* procedentes de vid descubrieron que estos poseían baja variabilidad genética.

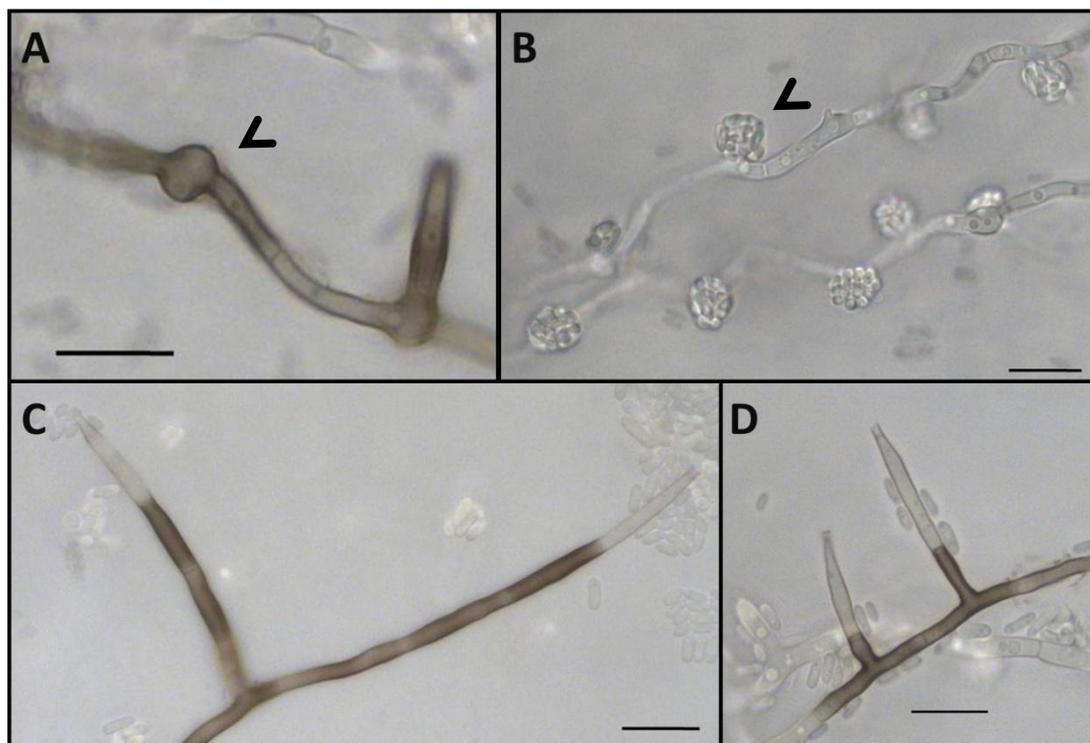


Figura 7. Estructuras somáticas y reproductivas de *Phaeomoniella chlamydospora*, observados en microscopia de contraste de fases. A) Estructuras parecidas a clamidosporas, B) Micelio aéreo con cúmulos de conidios, C y D) Hifas maduras con conidióforos y fiálides. Barra = 10 μm .

Caracterización de aislados putativos de *Phaeocremonium*

Los aislados seleccionados como *Phaeocremonium* presentaron en un principio micelio con una coloración blanca, el cual con el tiempo se fue tornando marrón. A los 7 u 8 días los cultivos presentaron colonias planas con coloración marrón tenue que con el tiempo llegaron a ser marrón-grisáceos o marrón fuerte y el micelio creció de una forma lanosa o algodonosa (Figura 8). Todos los aislados presentaron hifas septadas y ramificadas con una coloración desde casi hialina y marrón tenue (Figura 9). La tasa de crecimiento de estos aislados fue mayor a los identificados como *Phaeomoniella chlamydospora*.

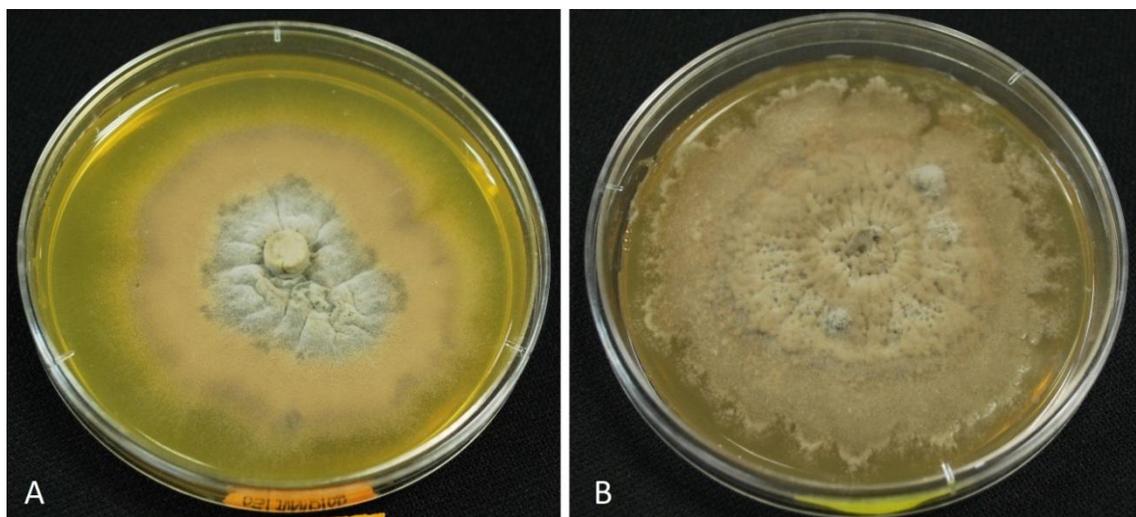


Figura 8. Morfología colonial de los algunos aislados de *Phaeocremonium* después de 4 semanas de incubación a 25°C. A) Temp02, B) STCSBM14-02.

Después de realizar las observaciones bajo el microscopio, se identificaron a los 9 aislados como *Phaeocremonium aleophilum* (anamorfo de *Togninia minima*, Mostert *et al.*, 2003) por sus características. Microscópicamente los aislados presentaron conidióforos mayormente no

ramificados y monofialidicos, la mayoría de las fiálides observadas fueron del tipo II y III lo cual es característico de *P. aleophilum*.

Los aislados Temp02 y Temp02-2 presentaron algunos conidióforos ramificados del tipo III con forma elongada-ampuliforme lo cual podría ser indicio que estos aislado pertenecen a la especie *P. parasiticum*, la cual presenta mayormente conidioforos ramificados, hifas tuberculadas y raramente presenta fiálides del tipo I y II, pero los aislados en cuestión presentaron muy pocos conidióforos ramificados, sus hifas no poseían tubérculos, y la mayoría de sus fiálides eran de tipo II y III, por lo que se descartó la posibilidad de que fueran *P. parasiticum* (Figura 9).

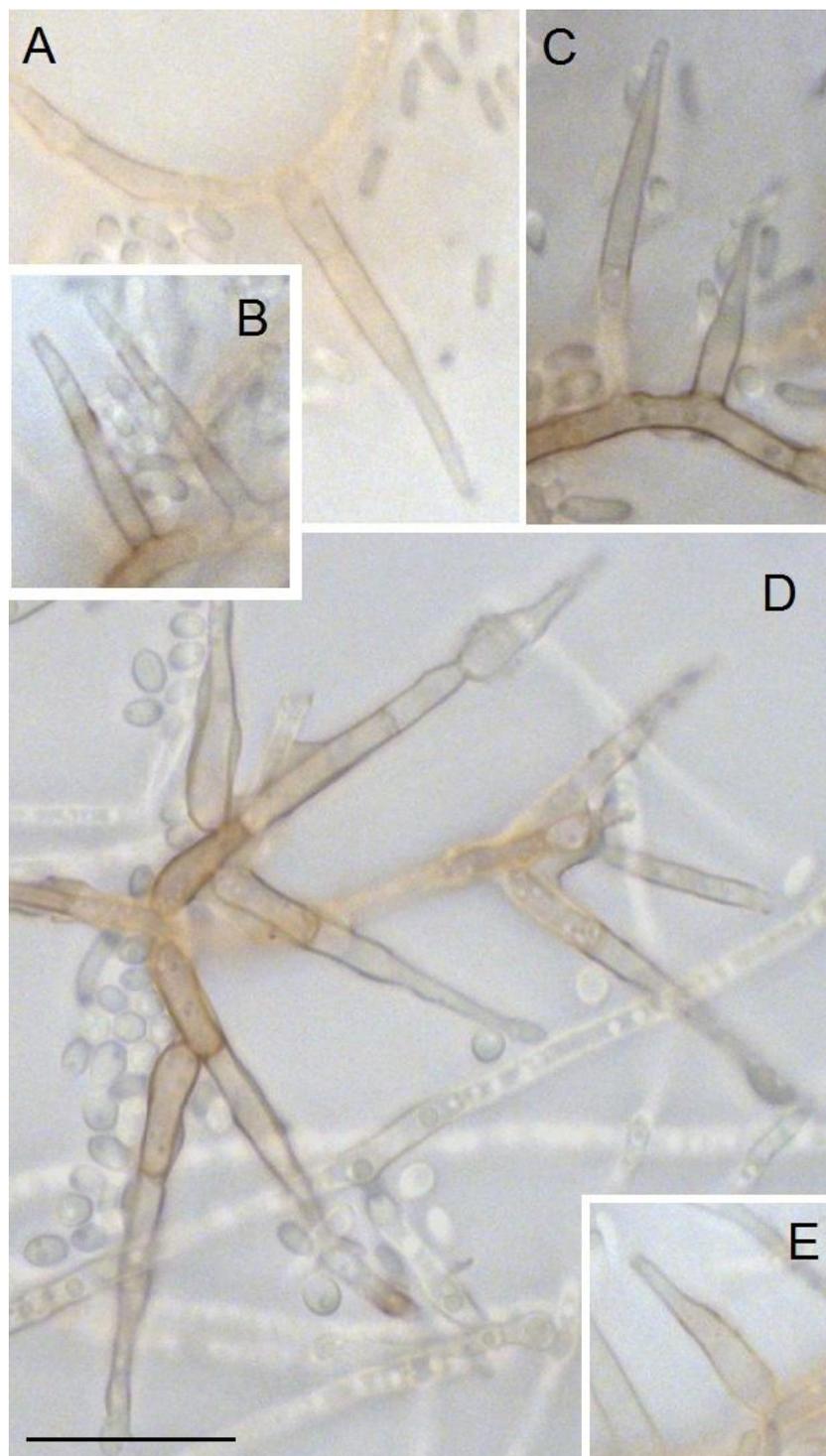


Figura 9. Conidióforos de *Phaeoacremonium aleophilum* observados por microscopía de contraste de fases. A y B) Fiálides de tipo III, C) Fiálides tipo III y II, E) Fiálide de tipo II, D) Conidióforo ramificado con fiálides elongadas-ampuliformes tipo III. Barra = 10 μ m.

Caracterización genética

Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones, se procedió a realizar una comparación contra la base de datos de nucleótidos del GENBAK del NCBI. Algunas secuencias no fueron incluidas dentro de los análisis filogenéticos ya que al momento de realizar BLAST no mostraron parecido alguno con ninguna secuencia, esto seguramente resultado de una secuenciación incorrecta.

Tabla III. Secuencias amplificadas por PCR usadas para realizar los análisis filogenéticos.

Aislado	ITS	ACT	β -tub	EF1- α
CC40-2	✓	-	✓	✓
CC42-2	✓	-	✓	✓
L501	✓	-	✓	✓
L506	✓	-	✓	✓
L509	✓	-	✓	✓
ME05	✓	-	✓	✓
N32	✓	-	✓	✓
R09	✓	-	✓	✓
SA32	✓	-	✓	✓
STCSBM7-2	✓	-	✓	✓
STCSBM7-10	✓	-	✓	✓
STCSBM10-2	✓	-	✓	✓
STCSBM13-1	✓	-	✓	✓
STCSBM13-2	✓	-	✓	✓
STCSBM14-2	✓	✓	✓	-
BY02-3	✓	✓	✓	-
BY05	✓	✓	✓	-
CT01	✓	✓	✓	-
CT02-1	✓	✓	✓	-
CT06	✓	✓	✓	-
ME01	✓	✓	✓	-
Temp02	✓	✓	✓	-
Temp02-2	✓	✓	✓	-

El análisis filogenético de las secuencias del ITS reveló que los aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* se agruparon en un solo clado junto con las secuencias de los aislados extranjeros (Figura 10), lo cual significa que el análisis molecular corroboró los resultados de la caracterización morfológica.

El árbol filogenético generado a partir de las secuencias del fragmento del factor de elongación de la traducción 1- α (EF1- α) reveló que todos los aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* analizados en este trabajo y las cepas españolas se agruparon en un clado bien definido (Figura 11), corroborando los resultados de la caracterización morfológica.

El análisis filogenético correspondiente a la secuencia parcial del gen de la β -tubulina, mostró que los aislados locales de *Phaeomoniella chlamydospora* se agruparon en un clado bien definido con las cepas provenientes de otros países (Figura 12), validando los resultados obtenidos mediante la caracterización morfológica y apoyando los resultados obtenidos en los otros árboles filogenéticos.

El análisis filogenético de las secuencias del ITS de los aislados de *Phaeoacremonium* reveló que la mayoría de los aislados se agruparon dentro de un clado que contuvo a *P. aleophilum* y *P. inflatipes* con un bootstrap de 46, mientras que los aislados ME01 y STCSBM14-2 formaron grupos separados con 98 y 88 valores de bootstrap respectivamente (Figura 13).

El análisis filogenético de la secuencia parcial del gen de la β -tubulina, reveló que todos los aislados analizados se agruparon en un clado bien diferenciado el cual contuvo a *Phaeoacremonium aleophilum* junto con cepas originarias de Sudáfrica con un valor de bootstrap de 99 (Figura 14).

El árbol filogenético generado a partir de las secuencias del fragmento de gen de la actina exhibió el mismo resultado que los resultados generados por el análisis del fragmento del gen de la β -Tubulina, agrupando a los aislados locales de un clado junto con cepas de *Phaeoacremonium aleophilum* provenientes de Hungría, Palestina e Italia (Figura 15).

La utilización de la secuencia del ITS y los genes del ADNr es uno de los métodos de caracterización molecular de especies más utilizado, y en el caso de *Phaeomoniella chlamydospora*, ésta es usualmente acompañada del análisis de las secuencias del gen de la β -tubulina o el EF1- α , los cuales debido a la baja variabilidad genética de la especie, proveen información complementaria a la caracterización morfológica. En cuanto al uso de otras técnicas moleculares como lo son los RAPDS y AFLP, estos pueden mostrar las variaciones genéticas entre los miembros de la especie y la definición de grupos genéticos en un grupo de aislados (Pottinger *et al.*, 2002).

Lo observado en el análisis filogenético tanto de las secuencias del ITS, β -tubulina y del EF1- α de los aislados locales de *Phaeomoniella chlamydospora* podría deberse a que la variabilidad genética de estos es muy baja, y concuerda con los reportado por Cobos y Martin, 2008; Pottinger *et al.*, 2002; Rightway *et al.*, 2002; Tegli *et al.*, 2000b, donde las secuencias varían en unas cuantas bases. Tegli (2000a) argumenta que la baja variabilidad genética de la especie es debida a su forma de reproducción.

En lo referente al análisis filogenético del ITS de *Phaeomoniella chlamydospora*, los aislados locales se agruparon en un solo clado con los aislados de distintas partes del mundo; esto indica que el origen geográfico del aislado no necesariamente le confiere cercanía filogenética con aislados de países o regiones cercanas. En cuanto a los aislados SA32 y ME05 la distancia

genética que presentan se pudo haber debido a una secuenciación incorrecta de los fragmentos de PCR o a que simplemente estos aislados difieren de los demás, esto se resolvería amplificando una vez más la secuencias y realizando nuevamente el análisis filogenético.

En lo que respecta al análisis del EF1-a, los aislados locales se agruparon dentro de un mismo clado con los aislados extranjeros los cuales probablemente pertenecen a un mismo grupo genético, por lo que se agruparon juntos, mientras que en el análisis de la β -tubulina, los aislados locales se agruparon junto con los aislados extranjeros demostrado nuevamente que la región geográfica de origen no determina el parentesco filogenético.

En cuanto a los aislados de *Phaeoacremonium*, en el árbol filogenético generado a partir de las secuencias del ITS, el hecho de que *P. aleophilum* y *P. inflatipes* se agruparan en una misma clado demuestra que la secuencia del ITS como tal no es suficiente para distinguir entre especies de este género. Se ha demostrado que realizando la digestión de este fragmento de ADN con varias enzimas de digestión, se puede diferenciar entre especies a partir del patrón de bandeo generado (Dupont *et al.*, 2002; Essakhi *et al.*, 2008; Tegli *et al.*, 2000b). Debido a que en este trabajo se utilizaron las secuencias parciales de los genes de la β -tubulina y actina, no se consideró necesaria la realización del análisis de restricción.

El uso de las secuencias parciales de los genes de la β -tubulina y actina resultaron de suma utilidad para la caracterización de las especies del género *Phaeoacremonium* como ha sido demostrado por Essakhi y colaboradores (2008), Mostert y colaboradores (2005, 2006) y como fue observado en este estudio. La separación de los aislados locales en los árboles filogenéticos y su

agrupación con otras cepas de *P. aleophilum* originarias de otros países, comprueba los resultados obtenidos mediante la caracterización morfológica.

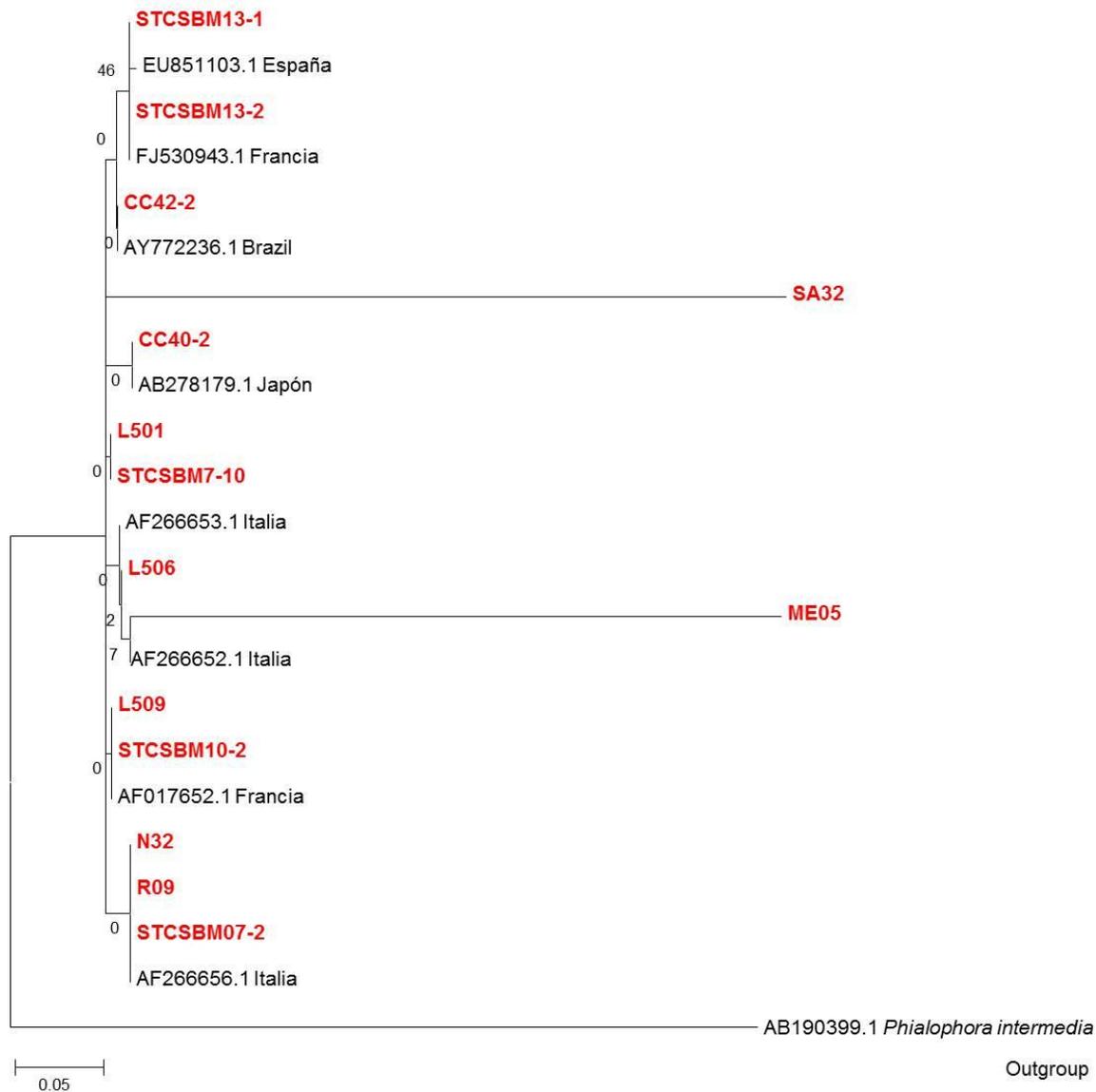


Figura 10. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias del ITS de los aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

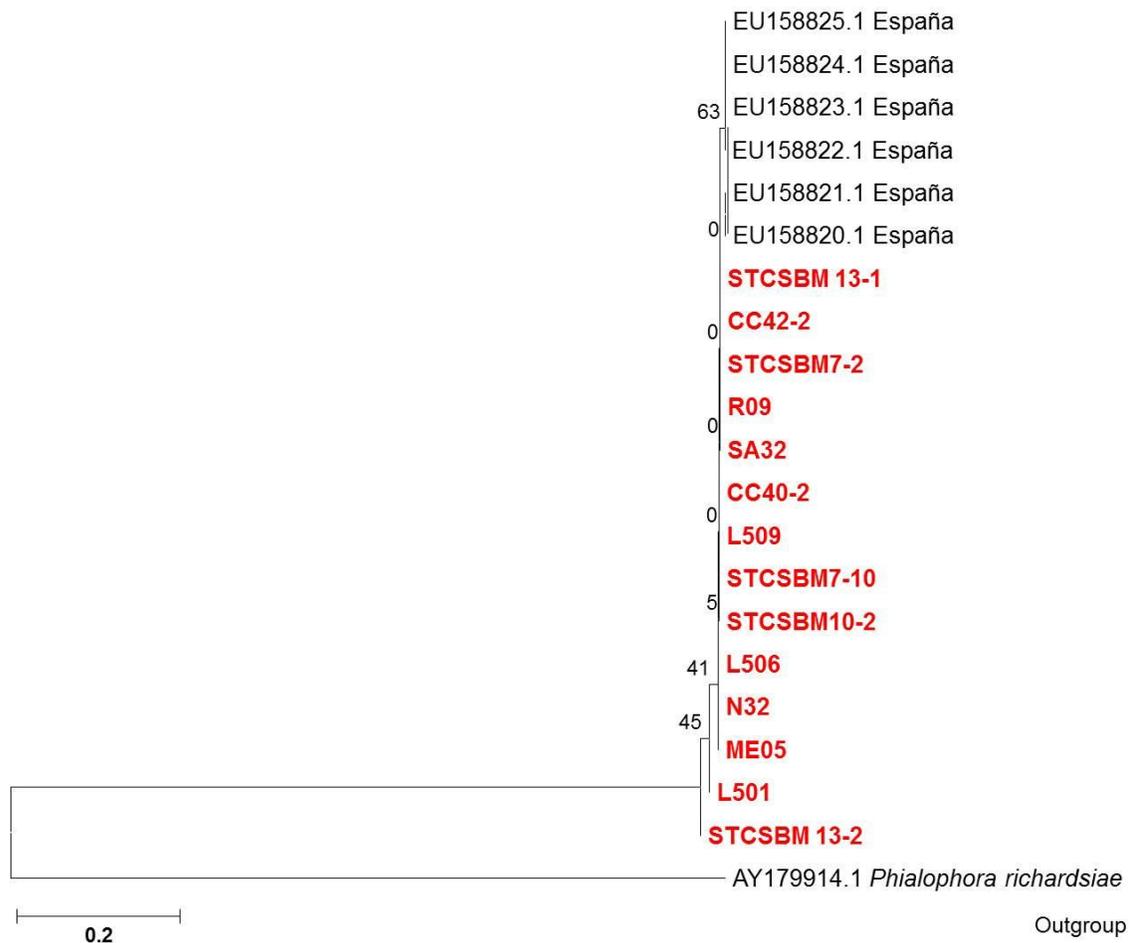


Figura 11. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen del factor de elongación 1- α (EF1- α) de los aislados de *Phaeoconiella chlamydospora* analizados en este estudio (color rojo) y otras aisladas en España, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

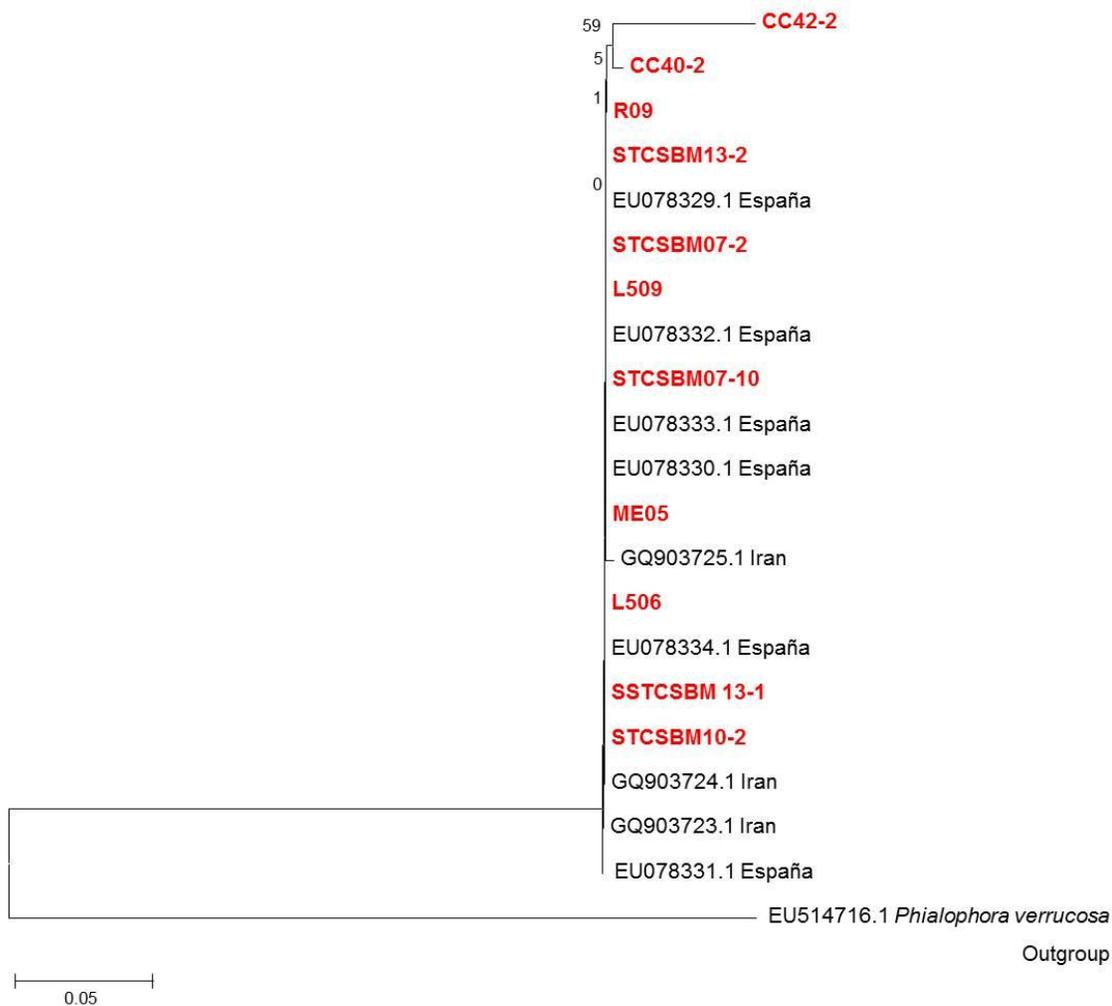


Figura 12. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de la β -tubulina de los aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

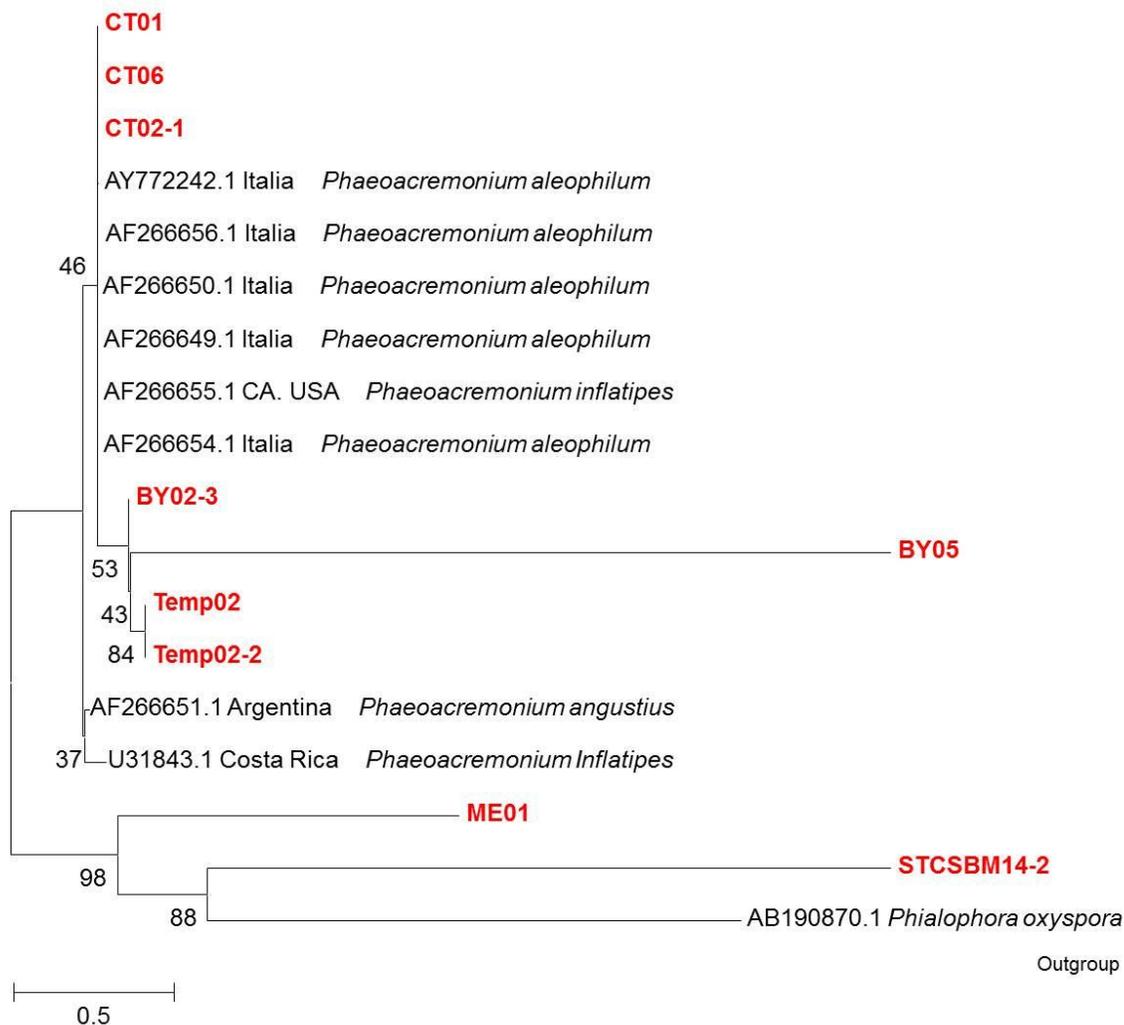


Figura 13. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias del ITS de los aislados de *Phaeoacremonium* analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

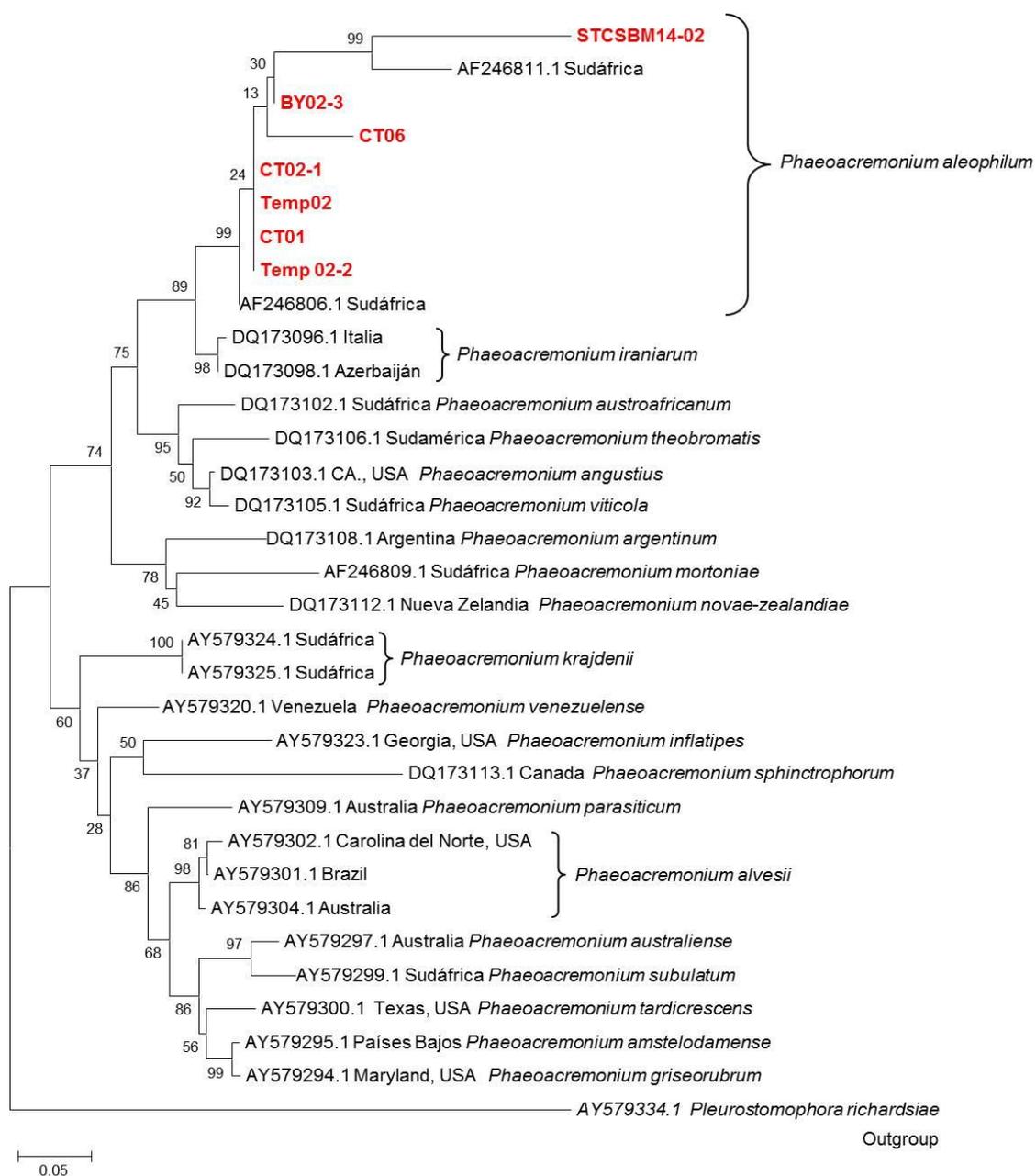


Figura 14. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de la β -tubulina de los aislados de *Phaeoacremonium aleophilum* analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

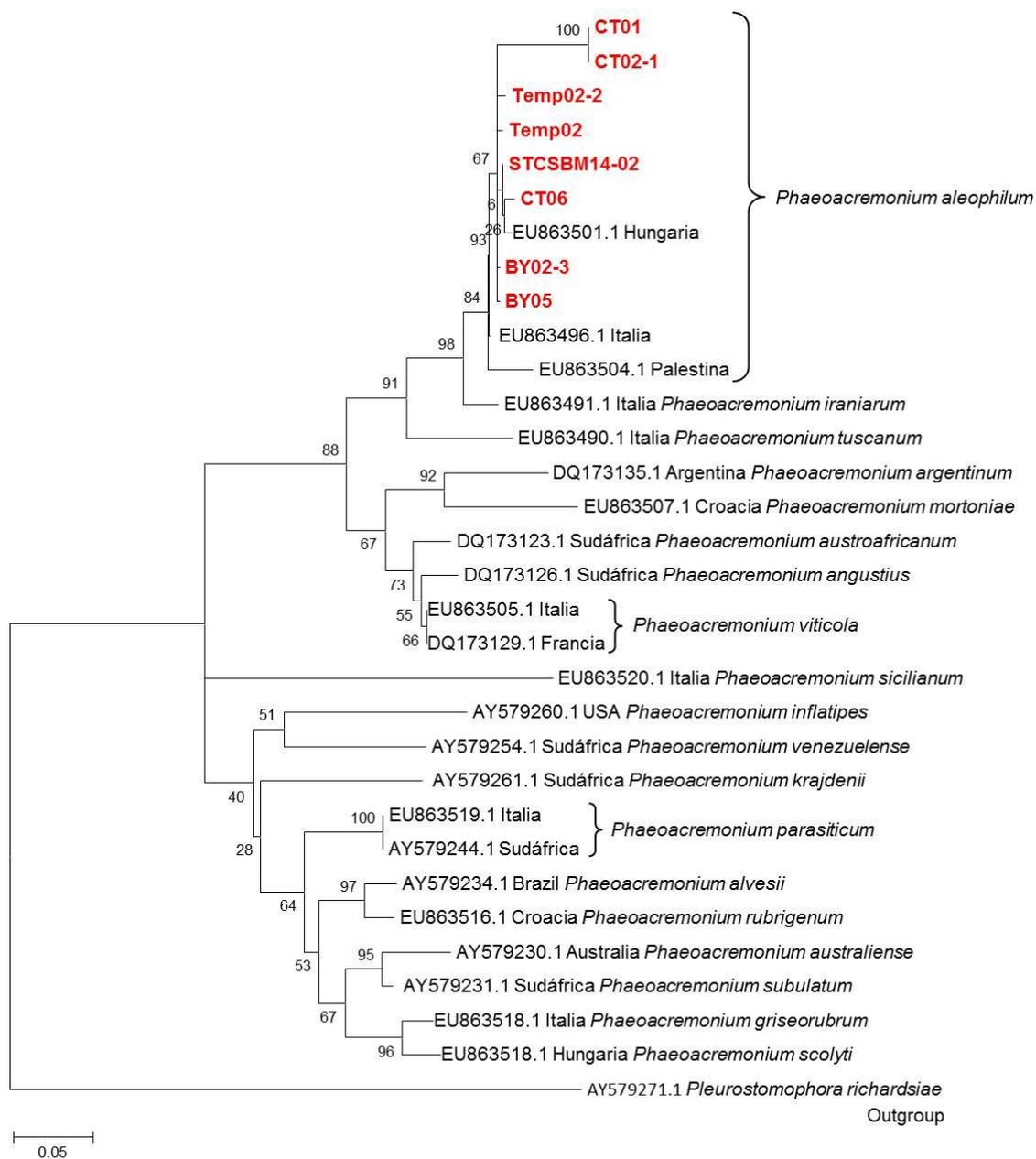


Figura 15. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias de un fragmento del gen de Actina de los aislados de *Phaeoacremonium aleophilum* analizados en este estudio (color rojo) y otras cepas aisladas en otros países, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y 500 réplicas en MEGA 4.0.

Ensayos de patogenicidad

La inoculación de 8 aislados: 5 de *P. chlamydospora* y 3 de *Phaeoacremonium*, sirvió para comparar su capacidad para provocar lesiones en tejido verde de vid. Las heridas presentaron coloraciones que iban desde el marrón claro al negro, y se extendían hacia arriba y abajo del punto de inoculación (Figura 17). Todos los aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* causaron heridas las cuales presentaron una coloración variable en el tejido verde de vid. Los aislados de *P. chlamydospora* causaron heridas con una mayor longitud en promedio que las causadas por *Phaeoacremonium* (Figura 16). El aislado STCSBM07-2 provocó las heridas con mayor extensión, con una longitud promedio de 12.5 mm a partir del punto de inoculación (Figura 17 D). No se observó micelio u otra estructura fúngica sobre la superficie de ninguno de los cordones inoculados ni sobre las heridas.

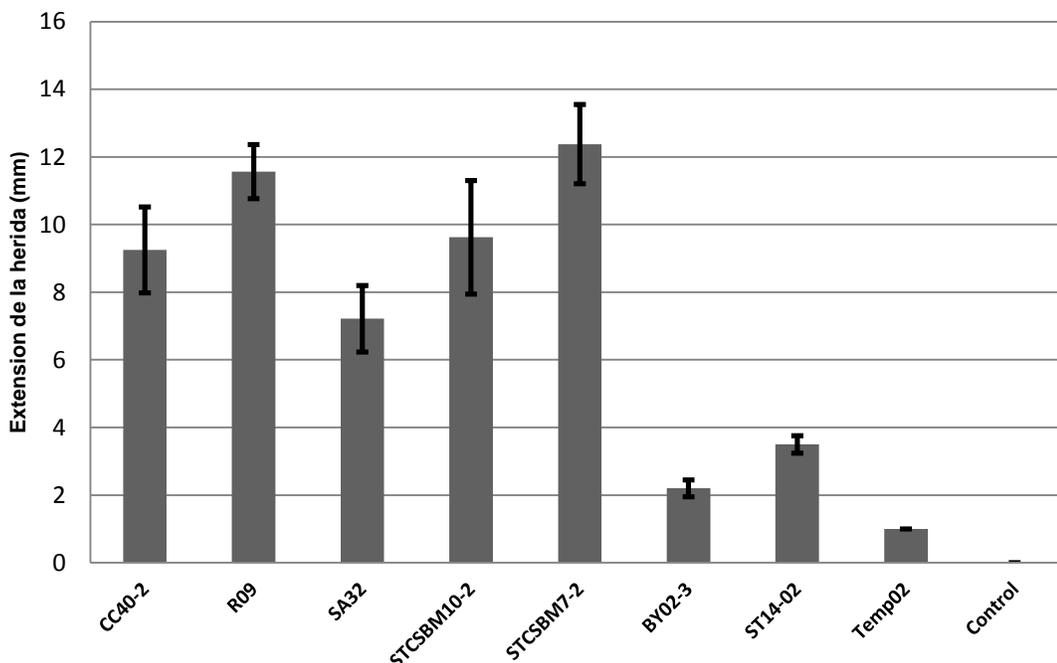


Figura 16. Longitud con error estándar de las lesiones provocadas por la inoculación de aislados de *P. chlamydospora* (CC40-2, R09, SA32, STCSBM10-2, STCSBM07-2), y *Phaeoacremonium* (BY02-3, STCSBM14-02, Temp02) en tejido verde de vid por 30 días.

El estado de las cañas inoculadas con *Phaeoacremonium* fue en general mejor que las inoculadas con *Phaeomoniella chlamydospora*, ya que las primeras presentaron algún grado de cicatrización en las heridas y la extensión de sus heridas fue mucho menor que las inoculadas con *P. chlamydospora*.

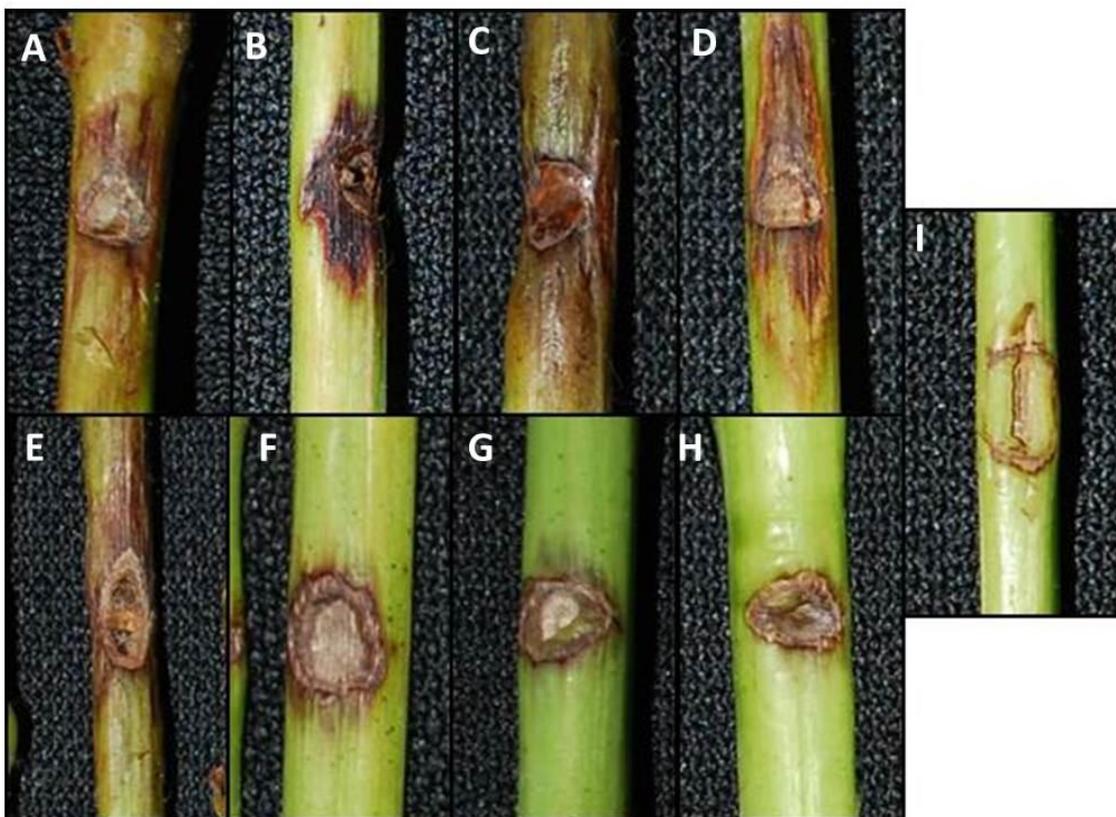


Figura 17. Lesiones ocasionadas por la inoculación de aislados de *Phaeomoniella chlamydospora* (A, B, C, D, E) y *Phaeoacremonium* (F, G, H). A) STCSMB10-2, B) SA32, C) R09, D) STCSMB07-2, E) CC40-2, F) ST14-02, G) TEMP02, H) BY02-3, I) Control.

Como parte final del ensayo de patogenicidad, se logró la recuperación de todos los aislados inoculados en tejido verde (Figura 18). Los cordones utilizados como control no presentaron necrosis visible, solo una cicatriz en la herida cubierta por tejido nuevo (Figura 17 I). Tampoco se recuperó ningún

hongo de ellos (Figura 18 C). Desafortunadamente el aislamiento de los hongos inoculados en el ensayo realizado en el tallo principal no dio resultados contundentes ya que la mayoría de los cultivos donde se pretendía recuperar el inóculo resultaron contaminados con *Neurospora crassa*, además que al final del experimento las plantas permanecieron asintomáticas.

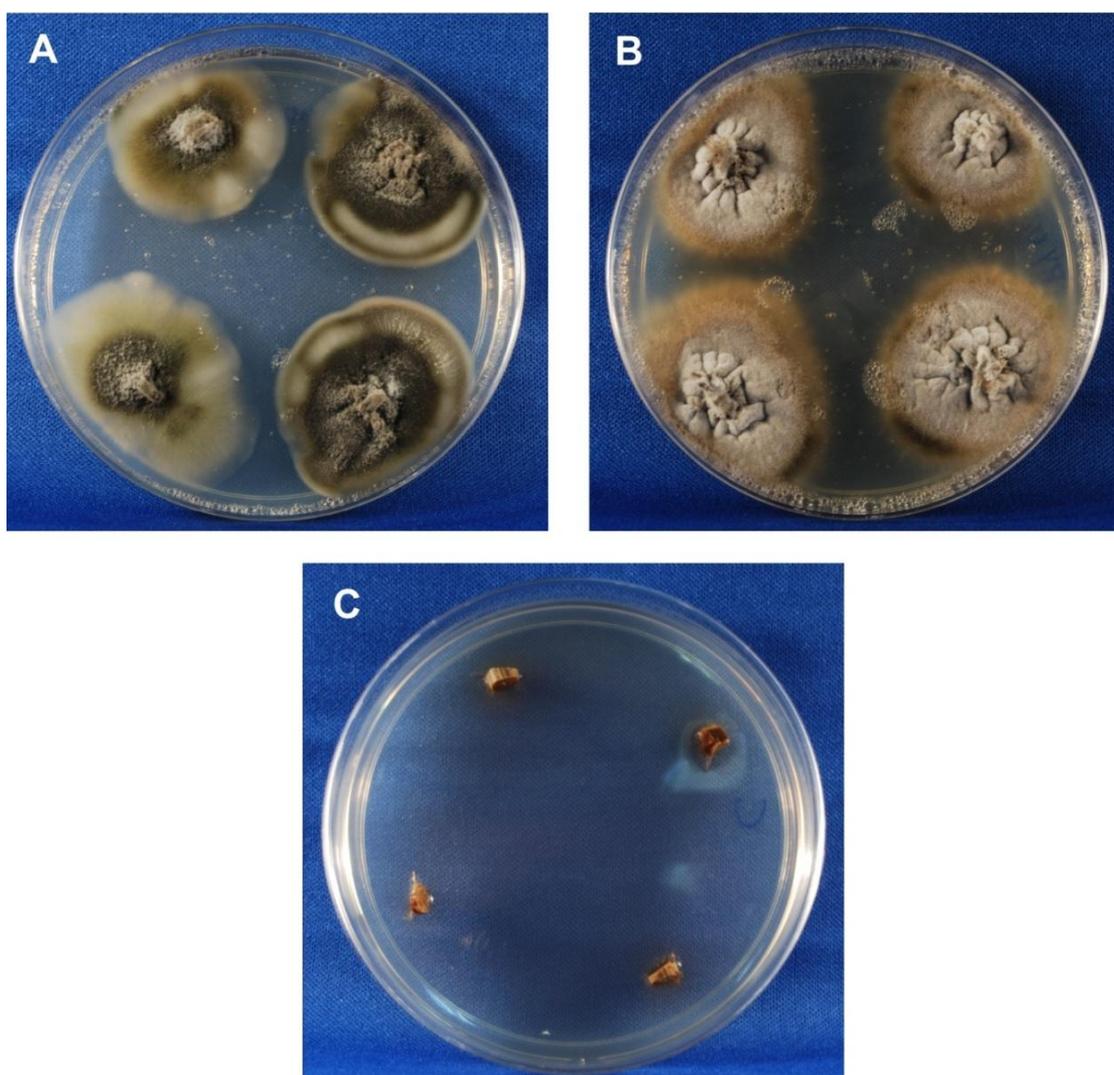


Figura 18. Algunos hongos recuperados después de 30 días de su inoculación en tejido verde de vid. A) CC40-2, B) BY02-3, C) Control.

Debido a que el tiempo que se tuvo disponible para estos ensayos fue muy corto, los resultados obtenidos son solo una aproximación de la patogenicidad de los aislados y no son comparables con ensayos de mayor duración. Ensayos realizados en campo con plantas de entre 3 y 15 años han demostrado que la inoculación de *P. aleophilum* y *P. chlamydospora* en combinación o individualmente provocan “brown wood streaking” (Adalat *et al.* 2000, Sparapano *et al.* 2001b, Feliciano *et al.* 2004, Haleen *et al.* 2005) crecimiento reducido de los brotes (Gubbler *et al.* 2001) y síntomas de Esca en el follaje y en los frutos (Sparapano *et al.* 2001a, Feliciano *et al.* 2004). Se puede concluir que el ensayo realizado en este trabajo no logra reproducir todos los síntomas del complejo de la Esca en su totalidad y que los síntomas foliares son una consecuencia de la suma de los factores bióticos y abióticos los cuales son muy difíciles de reproducir al momento de la inoculación y no son comprendidos en su totalidad hasta la fecha (Surico, 2006), por lo que es obvio que se requiere mayor conocimiento del complejo de la Esca en Baja California.

V

Conclusiones

Conforme a lo observado en campo, el complejo de la Esca parece ser un padecimiento emergente en nuestra región y el hecho que algunos de los hongos asociados a este complejo hayan sido aislados en viñedos locales debe de ser tomado como una amenaza para los vitivinicultores de Baja California.

El análisis molecular corroboró el resultado del análisis morfológico de *P. chlamydospora* *P. aleophilum* y se demostró que el origen geográfico de los aislados no determina la relación filogenética entre estos.

Tanto *P. chlamydospora* como *P. aleophilum* fueron capaces de producir daño en tejido verde de vid, pero para lograr la reproducción de síntomas es necesario realizar ensayos de mayor duración en plantas jóvenes y adultas.

La información generada en este trabajo será de utilidad para los viticultores de la región de Baja California ya que aporta información sobre de los hongos asociados con el deterioro progresivo de la vid; así conociendo que patógenos están presentes se podrán tomar medidas preventivas.

VI

Glosario

Alantoidal: Con forma de salchicha.

Ampuliforme: Con forma de botella, hinchado parcialmente en la parte basal.

Anamorfo: Estado asexual, conidial o imperfecto de un hongo, que produce sus esporas por mitosis.

Carpóforo: Término utilizado por micólogos franceses para referirse al cuerpo fructífero de los hongos superiores, en los que conidióforos, ascóforos y basidióforos tienden a reunirse para formar frutificaciones más complejas, que reciben respectivamente, los nombres de conidiocarpos, ascocarpos y basidiocarpos.

Clamidospora: Espora de origen asexual, recubierta por una pared celular gruesa y duradera, funciona como una spora de resistencia o latencia.

Collarcillo: Copa o estructura en forma de cáliz que se presenta en el ápice de la fiálide.

Conidio: Espora asexual nucleada, inmóvil, que generalmente se forma en el ápice o a un lado de una célula esporógena especializada.

Conidióforo: Hifa simple o ramificada que está morfológica y/o fisiológicamente

diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios, estos se encuentran generalmente sobre las células conidiógenas especializadas las cuales se pueden disponer de diversas formas.

Elipsoidal: Con forma de elipse.

Elongado: Alargado.

Fiálide: Tipo de célula conidiógenas que produce conidios blásticos (formados de novo).

Navicular: Con forma de barquilla o media luna.

Oblongo: Literalmente muy largo, más largo que ancho.

Obovado: Con forma de huevo.

Subgloboso: Casi globoso, casi esférico.

Teleomorfo: Esta sexual (perfecto) de un hongo cuyas esporas se producen por meiosis.

VII

Literatura citada

Adalat, K.; Whiting, C.; Rooney, S. y Gubler W.D. 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 92–99.

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Impreso en EUA. 949 pp.

Ajello, L.; Georg, L.K.; Steigbigel, R.T. y Wang C.J.K. 1974. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia*, 66: 490–498.

Ascunia, J. F.; Escalen, A. y Gubler, W.D. 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 66-69.

Aroca, A.; García, F.F.; Bracamonte, L.; Luque, J. y Raposo, A. 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevine in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.

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; Raposo, R. y Lunello, P. 2008. A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 1131-1140.

Bruno, G.; Sparapano, L. y Graniti, A. 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiophilous fungi in the wood tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 106-124.

Carbone, I. y Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553–556.

Calzarano, F. y Marco, S.D. 1997. Il mal dell'esca della vite: stato della ricerca. *Informatore Fitopatologico*, 9: 9–20.

Cobos, R. y Martin, M. T. 2008. Molecular characterization of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (España). *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.

Crous, W.P.; Gams, W.; Winfield, M.J. y Van Wyk P.S., 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88: 786-796.

Crous, W.P. y Gams, W. 2000. *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 112-118.

Di Marco, S.; Osti, F. y Cesari, A. 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 108-115.

Dupont, J.; Laloui, M. y Roquebert, M.F. 1998. Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. *Mycological Research*, 102:631-637.

Dupont, J.; Magnin, S.; Césari, C. y Gatica M. 2002. ITS and β - tubulin markers help delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *P. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research*, 106: 1143–1150.

Edwards, J. y Pascoe, I.G. 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australian Plant Pathology*, 33: 273-279.

Edwards, J.; Pascoe, I.G. y Salib, S. 2007. Impairment of grape vine xylem function by *Phaeomoniella chlamydospora* infection is due to more than physical blockage of vessels with 'goo'. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 87-90.

Essakhi, S.; Mugnai, L.; Groenewald, J.Z. y Surico, G. 2008. Molecular characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*, 21: 119-134.

Evidente, A.; Bruno G.; Andolfi, A. y Sparapano, L. 2000. Two naphthalenone pentaketides isolated from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca disease syndrome. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 162–168.

Ferreira, J.H.S; Van Wyk P.S. y Calitz F.J. 1999. Slow dieback of grapevine in South Africa: Stress-related predisposition of young vines for infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. South African Journal of Enology and Viticulture, 20: 43–46.

Fischer, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycological Progress, 1: 315–324.

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

Glass, N.L. y Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323–1330.

Gramaje, D.; Garcia-Jimenez, J. y Armegol, J. 2008. Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. Annals of Applied Biology, 153: 95-103.

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

Gubler, W.D.; Eskalen, A.; Feliciano, A. J. Khan, A. 2001. Susceptibility of grapevine pruning wounds to *Phaeomoniella chlamydospora*, and *Phaeoacremonium* spp. Phytopathologia Mediterranea 40: 482–483.

Gubler, W.D.; Thind, T.S.; Feliciano, A.J. y Eskalen A. 2004. Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 70–74.

Halleen, F.; Mostert, L. y Crous, P. W. 2005. Pathogenicity testing of *Phialophora*, *Phialophora*-like, *Phaeoacremonium* and *Acremonium* species isolated from vascular tissues of grapevines. Proceedings of the 4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Stellenbosch, South Africa: 58.

Hills, D.M. y Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.

Kakalíková, L.; Jankura, E. y Šrobarová, A. 2006. *Phaeomoniella chlamydospora*: causal agent of vine decline (*Vitis vinifera*) in the vineyards of Slovakia. *Plant Pathology*, 55: 815.

Krol, E. 2006. Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis* spp.) cuttings. *Journal of Plant protection Research*, 46: 353-357.

Larignon, P. y Dubos, B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 147-157.

Lecontome, P.; Leyo, M; Louvet, G.; Corio-Costet, M.F.; Gaudillère J.P. y Blancard, D. 2005. Le Black Dead Arm, genèse des symptomes. *Phytoma*, 587: 29–37.

Martín, M.T.; De la Iglesia, E.; Carrillo, N.; Rodríguez, L.; Fernández, M.; Velasco, M.; Vega, M.V.; y Cobos, R. 2005. Apuntes sobre los decaimientos de

la vid. En: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León Área de Coordinación y Transferencia de Tecnología (ed.). Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Valladolid, España.

Mostert, L.; Crous, W.P. y Groenwald, J.Z. 2003. *Togninia* (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646–659.

Mostert, L.; Groenewald J.Z.; Summerbell, R.C.; Sutton, D.A.; Padhye, A.A. y Crous, P.W. 2005. Species of *Phaeoacremonium* associated with human infections and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1752–1767.

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 Micology*, 54: 1–113.

Morton L. 1995. Mystery diseases hit young vines. *Wines and Vines*, 76: 46–47.

Mugnai, L; Graniti, A. y Surico, G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old elusive diseases of grapevine. *Plant Disease*, 83: 403-418.

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

Overton, E.B.; Stewart, L.E.; Qu, X.; Wenner, N.G. y Christ, B.J. 2004. Qualitative real-time PCR SYBR®Green detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 403-410.

Pascoe, I.G. y Cottral, E. 2000. Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 68–75.

Pottinger, B.; Stewart, A.; Carpenter, M. y Ridgway, H. J. 2002. Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 199-211.

Ridgway, H.J.; Sleight, B.E. y Stewart, A. 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeoconiella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australian Plant Pathology*, 31: 267-271.

Rooney-Latham, S.; Eskalen, A. and Gubler, W.D. 2005. Occurrence of *Togninia minima* Perithecia in Esca-Affected Vineyards in California. 2005. *Plant Disease*, 89: 867-871.

Santos, C.; Fragoneiro, S.; Valentin, H. y Phillips A. 2006. Phenotypic characterization of *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine cells. *Scientia Horticulturae*, 107: 123-130.

Scheck, H.J.; Vasquez, S. y Gubler, W.D. 1998. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease*. 82, 590.

Sepúlveda, J. 2009. Distribución geográfica y estadística de la viticultura en el estado de Baja California. Memorias del VI Seminario Internacional de Vitivinicultura. Ensenada, Baja California, México. 112 pp.

Surico, G.; Mugnai, L. y Marchi, G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 68-86.

Surico, G.; Mugnai, L. y Marchi, G. 2008. The Esca Complex Disease. En: *Integrated Management of Diseases Caused By Fungi* (Ciancio A. y Mukerji, K. G.) *Phytoplasma and Bacteria*. Springer Science + Business Media B. V. Firenze, Italia, 119-136.

Sparapano L.; Bruno, G. y Graniti, A. 1998. Esopolisaccaridi fitotossici sono prodotti in coltura da due specie di *Phaeoacremonium* associate al complesso del mal dell'esca della vite. *Petria*, 8: 210-212.

Sparapano, L.; Bruno, G. y Graniti, A. 2001a. Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 376–386.

Sparapano, L.; De Leonardis, S.; Campanella, A. y Bruno, G. 2001b. Interaction between esca-associated fungi, grapevine calli and micropropagated shoot cultures of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 423–428.

Siebert, J.B. 2001. *Eutypa*: The economic toll on vineyards. *Wines Vines*, 3:50-56.

Tabacchi, R.; Fkyerat, A.; Poliart, C. y Dubin, G-M. 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 156–161.

Tegli, S.; Santilli, E.; Bertelli, E. y Surico, G. 2000a. Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 125–133.

Tegli, S.; Bertelli, E. y Surico, G. 2000b. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 134–149.

Úrbez-Torres, J.R.; Leavitt, G.M.; Guerrero, J.C.; Guevara, J y Gubler W.D. 2008. Identification and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata* the causal agents of bot Canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 4: 519-529.

Úrbez-Torres, J.R. y Gubler, W.D. 2009. Patogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93:584-592.

Vaughan, J.G.; Geissler C.; Nicholson B.; Dowle E. y Rice E. 2009. *The new Oxford book of food plants*. Oxford University Press, Italia.

White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S. y Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA, 315–322.

Yan, Z.H.; Rogers, S.O. y Wang, C.J.K. 1995. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia*, 89: 72-83.

Referencias en internet

FAO, <http://www.faostat.fao.org/>. 2007. Roma, Italia.

NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2010. EUA.