

## Susceptibilidad a *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni, en diferentes variedades de vid (*Vitis vinifera* L.)

S. BOSO, J. L. SANTIAGO, V. ALONSO-VILLAYERDE, P. GAGO, M. C. MARTÍNEZ, H-H. KASSEMAYER

El mildiu es una de las enfermedades de vid más destructivas a nivel mundial, y está causado por el oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni. El objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles de susceptibilidad a *P. viticola* en algunas de las viníferas más utilizadas en diferentes viñedos europeos. Se estudiaron 5 variedades de *Vitis vinifera* L. conocidos como altamente susceptibles (cv. Albariño, Tempranillo, Touriga Nacional, Riesling, y Cabernet Sauvignon), y *Vitis rupestris*, considerada como altamente resistente. Se inoculó *P. viticola* en laboratorio, utilizando dos metodologías distintas (Técnica del disco de la hoja y plantas).

Los resultados obtenidos permitieron diferenciar tres grupos: uno formado por los poco susceptibles, en el que se incluían variedades como Cabernet Sauvignon y Riesling; un segundo grupo formado por los muy susceptibles, en el que se incluían el Albariño, Touriga Nacional y Tempranillo y un tercer grupo con el genotipo más resistente (*V. rupestris*). Además se describe el modo de colonización de *P. viticola* en estas variedades, tanto a nivel espacial como temporal, haciendo un seguimiento mediante microscopía de epifluorescencia, del curso de colonización del hongo por el mesófilo de la hoja, desde su penetración, hasta la formación de la vesícula subestomática y posterior formación de esporangióforos.

S. BOSO, J. L. SANTIAGO, V. ALONSO-VILLAYERDE, P. GAGO, M. C. MARTÍNEZ. Misión Biológica de Galicia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Apto de Correos 28, 36080 Pontevedra, Spain. Tel.: +34 986 854 800. Fax: +34 986 841 362. E-mail susanab@mbg.cesga.es.

H-H. KASSEMAYER. Abt. Biologie / Dept. Biology, Phytopathologie & Pflanzenschutz / Plant Pathology & Plant Protection, Staatliches Weinbauinstitut Merzhauser Strasse 119 D-79100 Freiburg im Breisgau. Tel.: +49 761 40165 947.

**Palabras clave:** spp *Vitis*, resistencia, severidad, incidencia, esporulación.

## INTRODUCCIÓN

El mildiu (*P. viticola*) es una de las principales enfermedades criptogámicas de la vid en gran parte de Europa. A consecuencia de su introducción en los viñedos a finales del siglo XIX, se ha ido propagando y causando serias pérdidas en la calidad y producción. Su control requiere una elevada inversión en fungicidas cada año. Una de las posibles alternativas para aumentar la resistencia contra *P. viticola* es la selección de variedades

o clones que muestren una menor susceptibilidad.

Dentro del género *Vitis* la susceptibilidad a *P. viticola* varía de unas especies a otras, entre variedades, y también entre clones de una misma variedad (LI, 1985; GALET, 1995; STAUDT y KASSEMAYER, 1995; BOSO *et al.*, 2006). La mayoría de los cultivares de la especie *V. vinifera* son altamente susceptibles, mientras que las especies *V. aestivalis*, *V. arizonica*, *V. berlandieri*, *V. doniana*, *V. palmata* y *V. rupestris* son parcialmente sus-

ceptibles, y *V. candidans*, *V. cinerea*, *V. cordifolia*, *V. monticola*, *V. riparia*, *V. rotundifolia* y *V. titania* son altamente resistentes.

La interacción planta-patógeno ha sido estudiada hasta el momento por diferentes autores (STAUDT y KASSEMAYER, 1995; BROWN *et al.*, 1999 a, b; KORTEKAMP *et al.*, 1998; KORTEKAMP y ZYPRIAN, 2003), pero comparando diferentes especies de *Vitis* o éstas con alguna variedad de *V. vinifera* como, por ejemplo, la variedad Müller-Thurgau con *V. riparia* o con híbridos (vinífera\*americana). En todos estos trabajos se profundiza en determinados aspectos como la morfología y desarrollo del hongo, la duración del período de incubación y la influencia de la temperatura, de la humedad relativa, o de la humedad sobre la hoja en el proceso de infección, enquistamiento de las zoosporas y período de esporulación (KIEFER *et al.* 2002, RIEMANN *et al.* 2002, RUMBOLZ *et al.* 2002). Sin embargo, son pocos los trabajos que existen comparando variedades de *V. vinifera*.

El objetivo de este trabajo fue comprobar los niveles de susceptibilidad a *P. viticola* en algunas de las viníferas más utilizadas en diferentes países europeos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal.

Se estudió un clon de cada una de las 5 variedades de *V. vinifera* conocidas como altamente susceptibles: Albariño (Clon 1), Tempranillo, Touriga Nacional, Riesling y Cabernet Sauvignon, y se utilizó como testigo la especie *V. rupestris* (cv. du Lot), considerada como altamente resistente.

En el mes de enero, una vez agostada la planta, de cada una de las variedades, se recogieron estaquillas con 2-3 yemas. Se procedió a su desinfección con 3 g/l de Captosán (Captan 40% + Carbendazima 8% P/P) y se parafinaron con una mezcla de cera-parafina (2:1). A continuación se conservaron durante unas semanas en cámara fría, ya que esto favorece después la brotación. Posteriormente, se seleccionaron 60 de estas

estaquillas por variedad, y se pusieron a brotar en invernadero, en condiciones controladas de temperatura y humedad (16 h de fotoperíodo, 25°C y 80-90% de humedad).

### Extracción, propagación y conservación del inóculo.

*P. viticola* se aisló en los meses de octubre-noviembre de hojas y sarmientos a partir de infecciones naturales del viñedo de la Misión Biológica de Galicia (CSIC), y se mantuvo en plantas susceptibles de *V. vinifera* cv. Albariño en el invernadero. Durante estos meses se indujo la producción de una cantidad apropiada de inóculo en una cámara climática con atomizador para inducir la esporulación.

### Metodología para las Inoculaciones dirigidas.

Se llevó a cabo mediante dos métodos: Técnica del disco de hoja y planta entera. La metodología utilizada para la **Técnica del disco de hoja** fue la propuesta por STAUDT y KASSEMAYER (1995) y por RUMBOLZ *et al.* (2002). Cuando el pámpano tiene entre 20-30 cm, se seleccionaron 5 hojas (5ª y 6ª contando a partir del ápice) de cada uno de las variedades a estudiar y otras 5 hojas de la especie testigo (*V. rupestris*). Todas las hojas se esterilizaron con etanol al 75% y después se hicieron tres lavados con agua destilada. A continuación se secaron con papel secante, y se cortaron 50 discos con un sacabocados (16 mm de diámetro). Posteriormente, se colocaron con el envés hacia arriba en placas de petri con una base de agar (0,8%). Cada uno de los discos se inoculó con *P. viticola* (50 µl de una suspensión de esporangios a una concentración de 25.000 esporangios ml<sup>-1</sup>), el período de incubación fue de cinco días a 25°C y con una humedad relativa superior al 95%, con 16 horas de luz blanca y 8 horas de oscuridad. Se repitió el experimento tres veces para cada una de las variedades. Al 5º día se observaron y evaluaron los síntomas de la infección, midiendo la incidencia de esporulación (IE: porcentaje de discos con esporulación) y necrosis (IN:

porcentaje de discos con necrosis), así como la densidad de esporulación (DE), mediante una escala visual (0%: densidad de esporulación nula o muy baja; 25%: baja; 50%: media; 75%: alta; 100%: muy alta). También se realizaron fotografías de cada disco, en las que posteriormente, mediante un analizador de imágenes, se midió la severidad de esporulación (SE: porcentaje del área de los discos con síntomas de esporulación) y necrosis (SN: porcentaje del área de los discos con síntomas de necrosis), según el método propuesto por BOSO *et al.* (2005).

Se siguió además la evolución del desarrollo del hongo en los discos mediante un microscopio de fluorescencia, durante los cinco días que permanecieron en incubación. Para ello, a las 24, 48, 72 y 96 hpi (horas postinoculación), se introducían tres discos para cada una de las variedades y repetición (3x6x3) en 30 ml de KOH 1M durante 3 o 4 días, y posteriormente se sometían a tinción (0,05% tinta china y 67mM  $K_2HPO_4$  pH 9,8), para hacer el seguimiento de la fase asexual del hongo (UNGER *et al.*, 2007). Se midieron, en los diferentes tiempos y en cada uno de los discos, los siguientes parámetros: frecuencia de vesículas subestomáticas (%), frecuencia de hifas (%), porcentaje de estomas infectados, frecuencia de haustorios (%) y longitud de las hifas.

### Técnica de la planta.

Se utilizó la metodología propuesta por BOSO *et al.* (2006). Cada una de las variedades a estudiar (5 plantas por variedad) y la especie testigo (*V. rupestris*), se pulverizaron con una suspensión de esporangios (25.000 esporangios  $ml^{-1}$ ). Posteriormente se cubrieron las plantas con un saco de polietileno húmedo, dejándolo actuar toda la noche a 25°C. Al día siguiente, se retiró el saco de plástico, y se mantuvieron las plantas en el invernadero durante 5-6 días. Las plantas inoculadas fueron cultivadas en una cámara climática bajo condiciones de día largo (luz blanca 300  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$  16 h, oscuridad 8 h), 25°C y humedad relativa superior al 95%. Al cabo de este tiempo se observó la incidencia

de esporulación, necrosis y de clorosis (porcentaje de hojas con esporulación, necrosis o manchas de aceite respectivamente), severidad de esporulación, necrosis y clorosis (porcentaje del área de los discos con síntomas de esporulación, necrosis y clorosis respectivamente), y la densidad de esporulación (medida igual que en la técnica del disco). Se repitió el experimento tres veces para cada uno de las variedades.

### Análisis Estadísticos.

Cada uno de los parámetros evaluados se sometió a un análisis de varianza (ANOVA), para comprobar si había diferencia significativas, al 5, 1 y 0,1 %, entre variedades. Se realizó la prueba F de significación contrastando cada factor fijo frente a su error. Todos los parámetros que en el análisis de varianza mostraron una F significativa se sometieron a una comparación de medias, mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) protegida de Fisher. Además se realizó un Análisis en Componentes Principales para poder visualizar de una forma clara el nivel de resistencia o susceptibilidad a mildiu, con todos los parámetros en conjunto. Ambos análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS System v8.1 (SAS, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron diferencias significativas para todos los parámetros al comparar las variedades susceptibles con la resistente y las variedades susceptibles entre sí. Tanto para la técnica del disco de hoja como para la de la planta (Cuadro1), se observó que dentro de los cultivares de *V. vinifera* que diferentes autores (LI, 1985; MELUC, 1991), consideraban como altamente susceptibles, existía una cierta variabilidad, pudiendo diferenciarse claramente dos grupos: uno formado por el menos susceptible, en el que se incluía el Cabernet Sauvignon que presentaba la menor Severidad (disco: 18,31) y baja densidad de esporulación (disco: 37,50). Un segundo grupo formado por los

Cuadro 1. Valores medios para cada una de las variedades estudiadas, mediante las diferentes técnicas empleadas (Técnica de los discos de hoja y Técnica de la planta).

Variedades	Técnica disco de hoja (n=300)				Técnica de la planta (n=15)						
	IE (%)	IN (%)	SE (%)	DE (%)	IE (%)	IN (%)	SE (%)	SN (%)	SA (%)	IA (%)	DE (%)
Albariño	100.00 A	0.00 A	48.51 A	100.00 A	96.33 A	13.00 B	100.00 A	5.13 B	83.40 A	91.66 A	91.33 A
Tempranillo	100.00 A	0.00 A	48.27 A	75.00 B	83.57 B	15.00 B	100.00 A	5.13 B	77.66 B	75.00 B	82.66 B
Touriga Nacional	100.00 A	0.00 A	35.45 B	100.00 A	75.55 B	13.00 B	83.33 B	5.00 B	58.33 C	65.00 B	56.73 D
Riesling	100.00 A	0.00 A	30.15 B	66.66 C	58.59 C	5.00 C	50.00 C	1.66 C	50.00 D	38.89 C	63.94 C
Cabernet Sauvignon	100.00 A	0.00 A	18.31 C	37.50 D	43.73 D	0.53 D	25.00 D	0.10 D	15.33 E	10.00 D	46.03 E
<i>Vitis rupestris</i>	18.00 B	82.00 B	9.30 D	3.53 E	0.00 E	70.40 A	0.00 E	30.33 A	0.00 F	0.00 E	0.00 F

Interacción variedad\*muestreo no significativa; Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna y cada carácter, no difieren significativamente al 5 %. IE: incidencia esporulación; IN: incidencia necrosis; IA: incidencia clorosis (manchas de aceite); SE: severidad esporulación; SN: severidad necrosis; SA: severidad clorosis (manchas de aceite); DE: densidad esporulación.

más susceptibles, entre los que destacaron el Albariño y las variedades Touriga Nacional y Tempranillo, que presentaron los valores más elevados (Figura 1, 2, 3).

En un tercer grupo se situó *V. rupestris*, que se diferenció significativamente del resto (Figuras 1, 2, 3 y 4). Esta variedad presentó un porcentaje de necrosis muy elevado con ambas técnicas y esporulación nula en la técnica de la planta y muy baja (18%) en el caso de los discos de hoja. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (WIEDEMANN-MERDINOGLU *et al.*, 2006; UNGER *et al.* 2007). Este retraso en el crecimiento de las hifas y

ausencia de esporulación, puede ser atribuido a que aunque probablemente las células del huésped responden a la invasión del patógeno en ambos casos, la respuesta es más reducida en los discos, ya que no existe una conexión entre todos los mecanismos de defensa, como ocurre en el caso de la planta entera. A esto también se puede sumar el hecho de que en los discos de la hoja hay una disminución de la actividad metabólica. La presencia de necrosis en *V. rupestris* es algo ya demostrado por distintos autores (DAI *et al.*, 1995; BUSAM *et al.*, 1997; KORTEKAMP *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 1999 a, b; DICK, 2002; RUMBOLZ *et al.*, 2002;

Cuadro 2. Valores medios de algunos parámetros evaluados en el proceso de infección y desarrollo del hongo en los discos mediante microscopio de fluorescencia. Observaciones a las 24 horas postinoculación (hpi) en todos los genotipos estudiados y a las 48hpi en el genotipo resistente.

Variedades	24hpi			
	% estomas infectados	Frecuencia de hifas (%)	Longitud de hifas (µm)	Frecuencia de haustorios (%)
Albariño	51.29 A	64.85 A	155.04 A	5.64 A
Tempranillo	42.87 B	59.42 AB	135.42 B	5.51 A
Touriga Nacional	32.05 C	48.30 C	60.38 D	3.93 B
Riesling	28.75 C	55.21 BC	88.88 C	3.88 B
Cabernet Sauvignon	20.06 D	29.46 D	64.39 D	2.48 C
<i>Vitis rupestris</i>	12.74 E	9.16 E	41.31 E	0.77 D
	48hpi			
<i>Vitis rupestris</i>	10.78	14.00	238.05	14.43

Interacción variedad\*muestreo no significativa; Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna y cada carácter, no difieren significativamente.

KORTEKAMP y ZYPRIAN, 2003; BOSO *et al.*; 2006), y parece deberse a la respuesta de hipersensibilidad que tiene lugar en las hojas de variedades resistentes. Esta respuesta está relacionada con la muerte programada de las células del huésped alrededor del lugar en el que se produjo la infección, y también con la liberación de diferentes tipos de oxígeno reactivo (RASKIN, 1992; KORTEKAMP y ZYPRIAN, 2003). Otros autores como Langcake y LOVELL (1980) y BARLASS *et al.* (1987) señalan que esta reacción también está asociada a la producción de fitoalexinas (precursores del resveratrol), y que las células necróticas son el resultado de altas concentraciones de compuestos fitotóxicos. Los mismos autores han observado el mismo comportamiento en hojas infectadas por otros hongos, como *Botrytis cinerea*. En el caso de los cultivares susceptibles, sin embargo, la presencia de bajos porcentajes de necrosis es debida a la muerte del tejido celular provocada por el estrés causado por la invasión del tejido vegetal por parte del hongo.

Con la ayuda del microscopio de fluorescencia se realizó el seguimiento en las diferentes variedades del desarrollo de *P. viticola* durante su fase asexual (Cuadro 2 y Figura 3). Se fueron observando los distintos estadios desde que penetra en el interior de la célula hasta la producción de esporangios y zoosporas (vesícula subestomática, vesícula subestomática con hifa primaria, hifa, micelio, espacio intercostal completamente invadido por el micelio). A las 24 horas postinoculación (hpi) ya se pudieron ver diferencias significativas entre las distintas variedades. Así, para algunos parámetros como longitud de las hifas se observaron oscilaciones entre 155,04  $\mu\text{m}$ -60,38  $\mu\text{m}$ . Las variedades Albariño, Tempranillo, Touriga Nacional y Riesling se caracterizaron por tener un mayor porcentaje de estomas infectados y en general el desarrollo del hongo parecía más avanzado que en el resto, presentando ya un mayor número de hifas, mayor longitud de éstas y con un gran número de haustorios. Fue curioso el comportamiento de Touriga Nacional que a pesar de estar entre las más

afectadas presentaba las hifas de menor tamaño y con bajo número de haustorios. Por el contrario, en la variedad menos susceptible (Cabernet Sauvignon) el proceso de infección y formación de hifas fue más lento. Esto puede ser debido a que el mecanismo de resistencia no se desencadene en el momento de la penetración sino que sea posterior. Es decir, que podría no existir ningún mecanismo que obstaculice directamente la entrada del hongo, o que retrase el proceso de infección. Este aspecto tendrá que ser verificado en el futuro.

Al comparar las variedades susceptibles con *V. rupestris* se observaron siempre, para todos los parámetros, diferencias significativas entre ellos.

A las 48hpi no se pudieron observar diferencias entre la mayoría de las viníferas ya que el micelio ocupaba completamente los espacios intercelulares. En Cabernet Sauvignon se pudo observar un micelio menos denso y menos desarrollado que en el resto. A las 72-96hpi, todas las variedades de *Vitis vinifera* ya presentaban esporulación con esporangióforos y esporangios. En la mayoría de los casos los esporangios ya estaban libres, no pudiendo observarse tampoco diferencias entre ellos. En el caso de Albariño o Touriga Nacional, la presencia de pelos tumados en el envés de la hoja dificultaba todavía más su observación.

*V. rupestris*, se caracterizó por tener pocas infecciones y pocas hifas, aunque éstas eran de gran longitud. A las 48 hpi se observaron todavía muchas vesículas subestomáticas con hifas primarias y se podía observar la presencia de una baja frecuencia de hifas, de formación muy lenta y de muy pequeño tamaño. Esta situación continuó más o menos igual después de 96hpi, al cabo de las cuales se observaban todavía infecciones que no habían evolucionado, y también hifas de formación muy lenta. A veces incluso se podían ver hifas exteriores como consecuencia del estrés de la planta. La parada en el desarrollo del hongo que se había observado a simple vista en los discos de la hoja y en la planta, se comprueba ahora, a través del

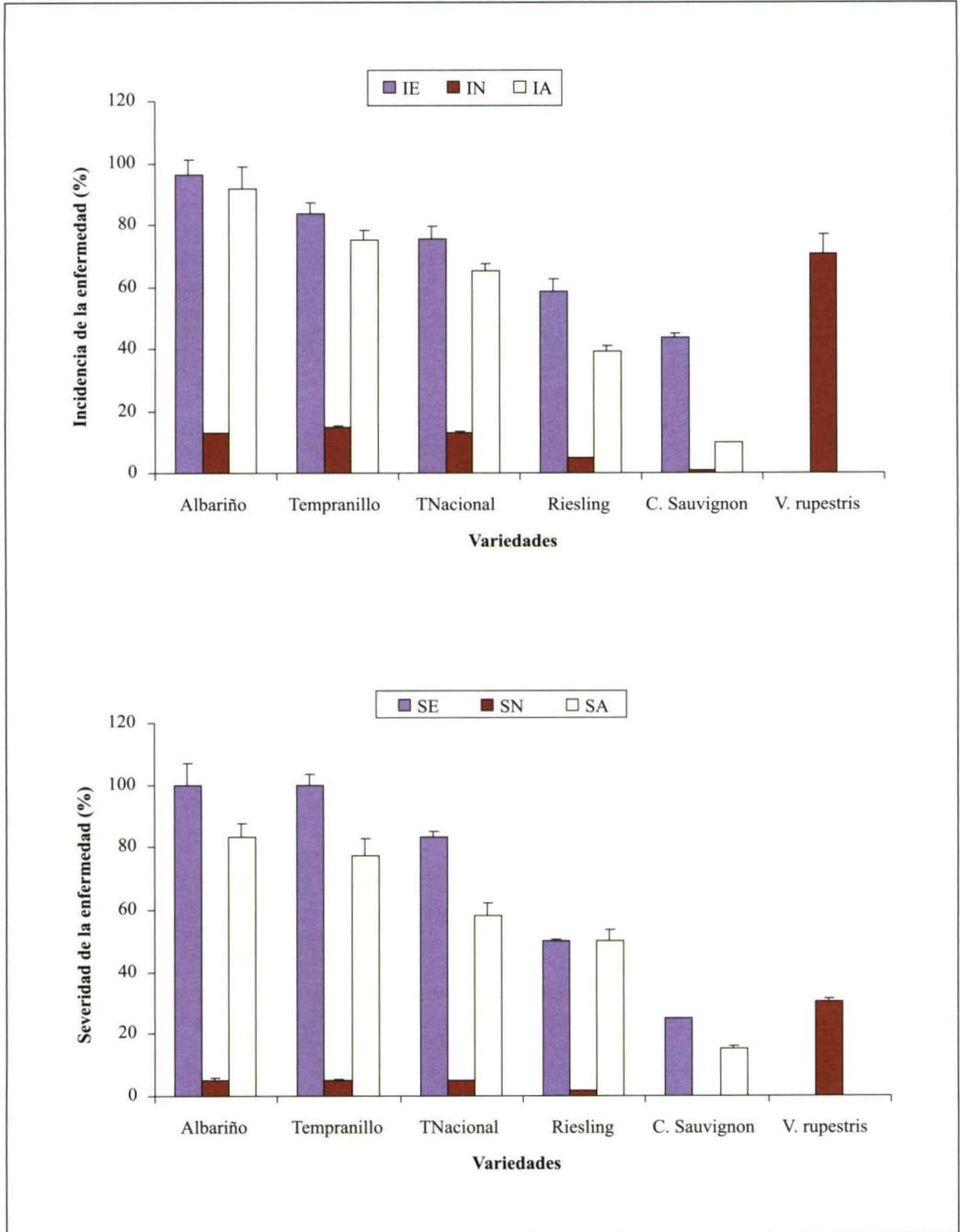


Figura 1. Incidencia y severidad de la enfermedad (%). Porcentaje de esporulación, de necrosis y manchas de aceite (clorosis), mediante la técnica de la planta.

IE: incidencia de esporulación; IN: incidencia de necrosis; IA: incidencia de manchas de aceite; SE: severidad esporulación; SN: severidad necrosis; SA: severidad manchas de aceite

microscopio que se debe a que en las variedades resistentes se interrumpe el ciclo de vida de *P. viticola*, como consecuencia de la rápida respuesta de defensa de la planta (aumento en la síntesis de fitoalexinas, pro-

cesos de lignificación, formación de calosa, polímeros de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3 etc. ).

Para intentar resumir el comportamiento de los genotipos estudiados, se realizó un ACP

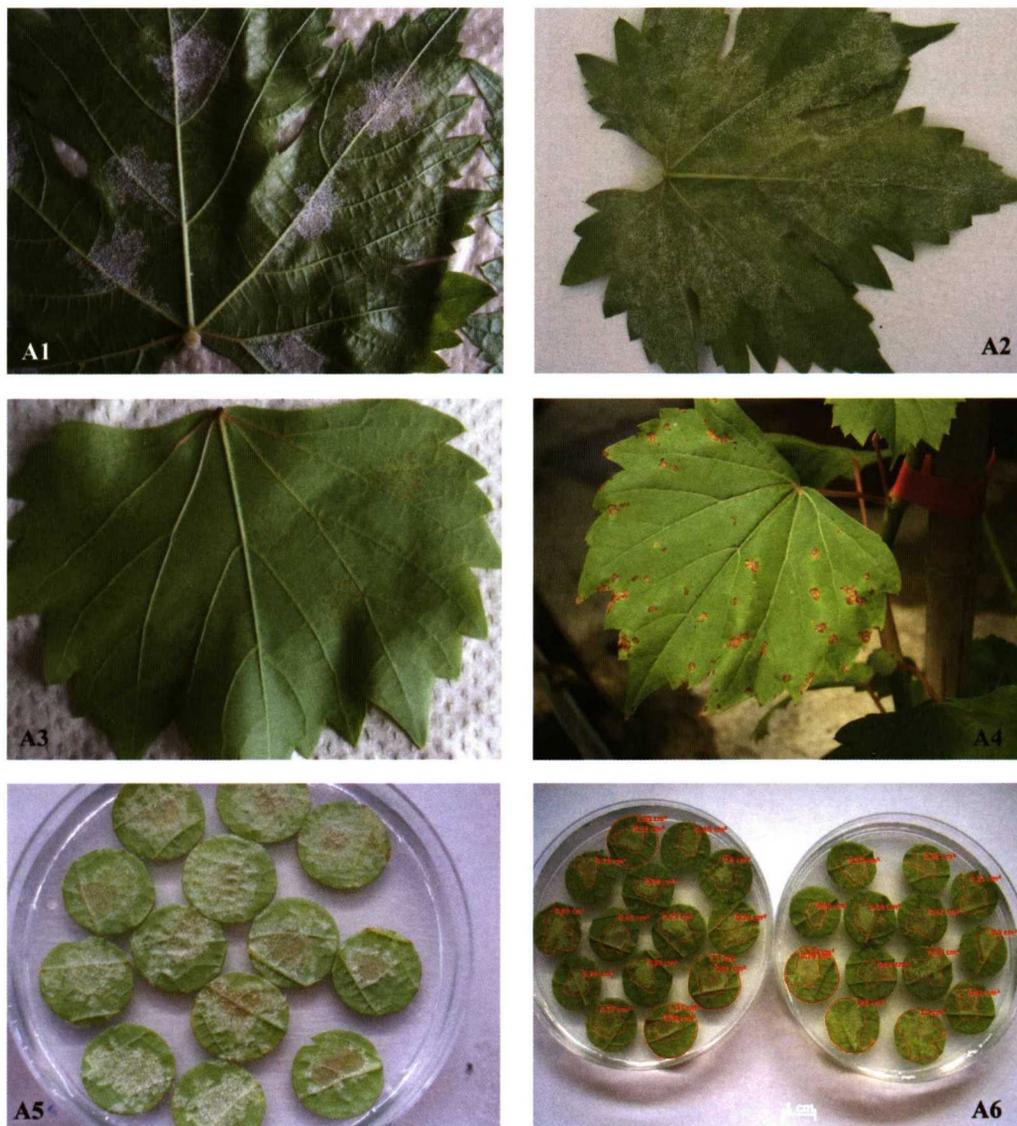


Figura 2. Observaciones de los diferentes niveles de susceptibilidad a *P. viticola* en los genotipos susceptibles y resistentes mediante las técnicas de la planta y de los discos. A1-A2: Hojas de la variedad Tempranillo altamente susceptible. A3-A4: Hojas de la variedad testigo resistente (*Vitis rupestris*). A5-A6: Detalle de esporulación en discos de las variedades más susceptibles (Albariño y Tempranillo).

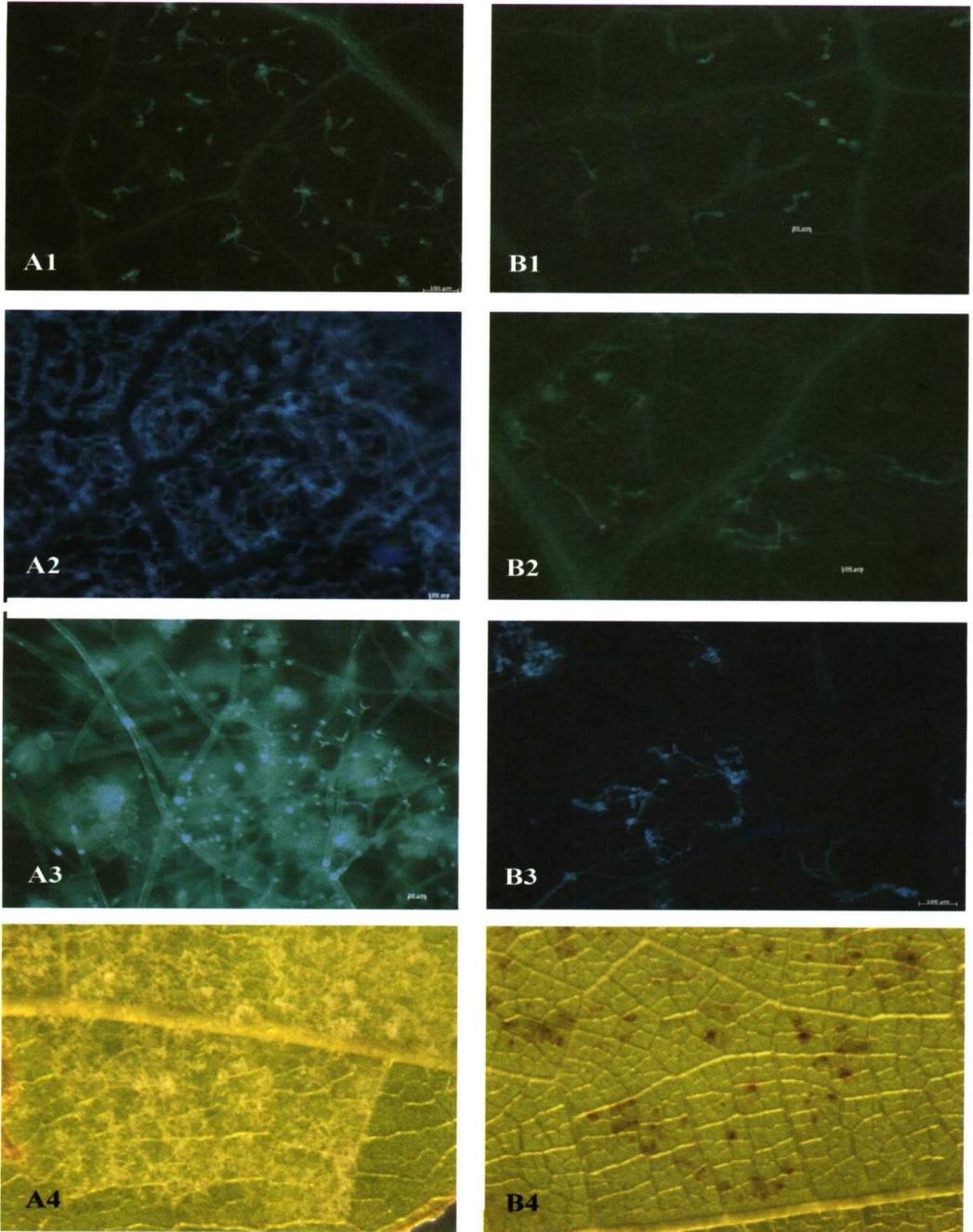


Figura 3. Seguimiento mediante microscopio de fluorescencia del desarrollo de *P. viticola* durante su fase asexual en las diferentes variedades de vid. A1-A3: Detalle del desarrollo de *P. viticola* a las 24, 48 y 72 horas postinoculación (hpi) en un genotipo susceptible (cv. Tempranillo). B1-B3: Desarrollo de *P. viticola* a las 24, 48 y 72 horas postinoculación (hpi) en el genotipo resistente (*Vitis rupestris*). A4 y B4: Visualización de esporulación (cv. Tempranillo) y de necrosis (*Vitis rupestris*) respectivamente, mediante microscopio estereoscópico.

con todos los parámetros de disco y planta evaluados. Los resultados mostraron que las dos primeras componentes acumularon el 91,7 % de la variabilidad total expresada (Prin1: 84,20%, Prin2: 7,50 %). En la Figura 4 se muestra la distribución de las variedades en función de las dos primeras componentes. En Prin1, los parámetros con mayor peso fueron: incidencia de esporulación en planta; densidad y severidad de esporulación en planta y disco; frecuencia de hifas; longitud de hifas. En Prin2, los parámetros con mayor peso fueron: incidencia de necrosis en disco y planta; severidad de necrosis en planta; incidencia de esporulación en disco (existe una correlación negativa para este parámetro con el resto de los parámetros); incidencia y severidad de manchas de aceite en planta, y por último %

de estomas infectados (Cuadro 3). En el gráfico obtenido se pueden diferenciar tres grupos: uno formado por los poco susceptibles, en el que se incluían variedades como Cabernet Sauvignon y Riesling; un segundo grupo formado por los muy susceptibles, en el que se incluían el Albariño, Touriga Nacional y Tempranillo y un tercer grupo con el genotipo más resistente (*V. rupestris*). Estos resultados corroboraron lo observado en la comparación de medias.

Se podría concluir diciendo que existe variabilidad en la susceptibilidad entre distintas variedades de *V. vinifera*. Se ha observado también, en estas variedades, que las primeras fases de desarrollo del hongo eran lentas, probablemente debido a la interacción del patógeno con el huésped. Posteriormente,

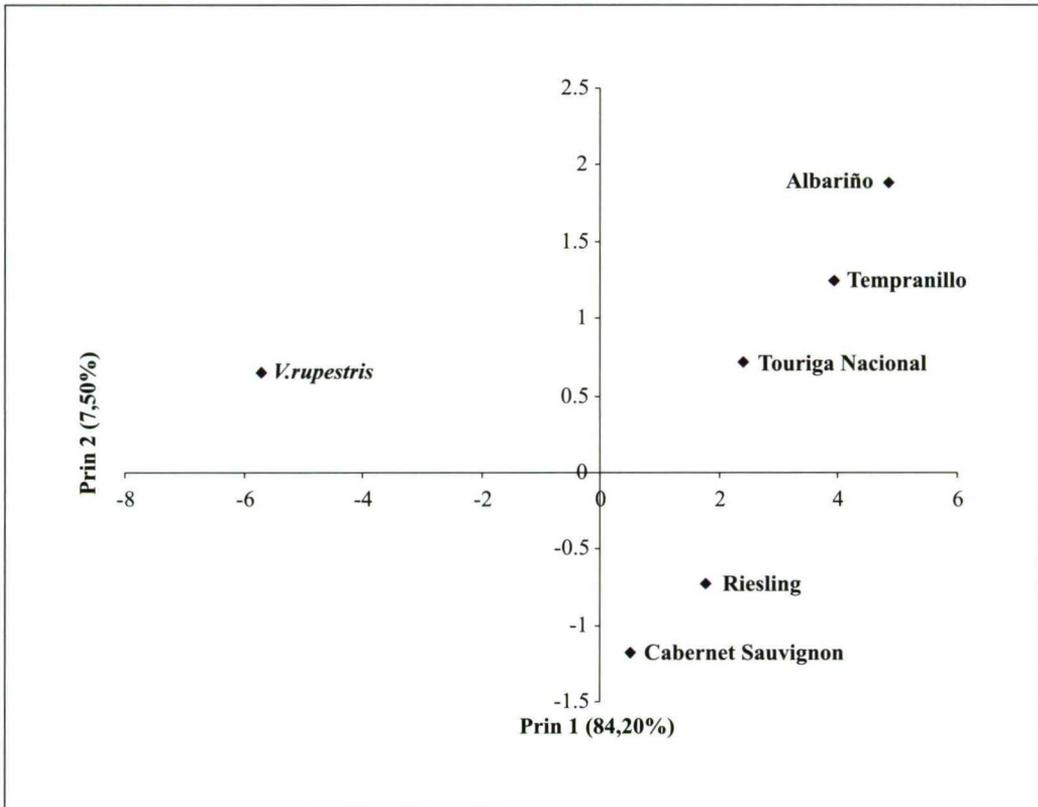


Figura 4. Análisis en Componentes Principales para todas las variedades y con todos los parámetros evaluados.

la colonización por parte del micelio y, a continuación, la esporulación fue más rápida, dependiendo de la susceptibilidad o grado de resistencia de las distintas variedades. Las observaciones realizadas al microscopio confirmaron las realizadas a simple vista mediante las técnicas de la hoja y de la planta.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. EIRAS (Estação Vitivinícola Nacional Dois Portos, Portugal) y al Dr. MARTÍNEZ DE TODA (Universidad de La Rioja) por el suministro de los clones de las variedades españolas y portuguesas.

## ABSTRACT

BOSO, S., J. L. SANTIAGO, V. ALONSO-VILLAVARDE, P. GAGO, M. C. MARTÍNEZ, H. H. KASSEMAYER. 2008. Susceptibility to *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni, in different grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**: 387-397.

Downy mildew, caused by the obligate oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni., is one of the most destructive grapevine diseases occurring worldwide. The aim of the present study was to examine susceptibility to infection by *P. viticola* in different grapevine varieties grown in European vineyards.

Five cultivars of *V. vinifera* L. known to be susceptible (Albariño, Tempranillo, Touriga Nacional, Riesling and Cabernet Sauvignon), and one *Vitis* genotypes known to be resistant (*V. rupestris*) were examined. Plants were inoculated with *P. viticola* in the laboratory using the leaf disc and plant techniques.

The obtained results demonstrated, that there were 3 groups: one formed by those little susceptible, e.g., cvs. Cabernet Sauvignon and Riesling; and a second group formed by those very susceptible, cvs. Albariño, Touriga Nacional and Tempranillo, and a third group of more resistant genotype (*V. rupestris*). Furthermore, the course of colonization of leaf mesophyll by *P. viticola* was described in these varieties, both spatial and temporary level, making a monitoring through microscopic epifluorescence, from its penetration to the formation of the substomatic vesicle, and later formation sporangiophores

**Key words:** spp *Vitis*, resistance, disease severity, disease incidence, sporulation.

## REFERENCIAS

- BARLASS, M., MILLER, R. M., DOUGLAS, T. J. 1987. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production. *Am. J. Enol. Viticult.*, **38**: 65-68.
- BOSO, S., SANTIAGO, J. L., MARTÍNEZ, M. C. 2005. A method to evaluate downy mildew resistance in grapevine. *Agronomie*, **25**: 163-165
- BOSO, S., MARTÍNEZ, M. C., UNGER, KASSEMAYER S., H. H. 2006. Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albariño clones. *Vitis*, **45** (1), 23-27.
- BROWN, M. V., MOORE, J. N., FENN, P., MCNEW, R. W. 1999 a. Comparison of leaf disk, greenhouse, and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance. *Hortscience*, **34**: 331-333.
- BROWN, M. V., MOORE, J. N., FENN, P., MCNEW, R. W. 1999 b. Inheritance of downy mildew resistance in table grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **124** (3): 262-267.
- BUSSAN, G., KASSEMAYER, H.-H., MATERN, U. 1997. Differential expression of chitinases of *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.*, **115**: 1029-1038.
- DAI, G. H., ANDARY, C., MONDLOTT-COSSON, L., BOUBALS, D. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **46**: 177-188.
- DICK, M. W. 2002. Towards and understanding of the evolution of the downy mildew. Advances in downy mildew research. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- GALET, P. 1995. Précis de Pathologie viticole. 2ème édition. Imprimerie JF Impression, Montpellier.
- KIEFER, B., RIEMANN, M., BÜCHE, C., KASSEMAYER, H.-H., NICK, P. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, **215**: 387-393.
- KORTEKAMP, A., WIND, R., ZYPRIAN, E. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine varieties. *J. Plant Dis. Protec.*, **105**: 475-488.

- KORTEKAMP, A., ZYPRIAN, E. 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant. Physiol.*, **160** (11): 1393-1400
- LANGCAKE, P., LOVELL, P. A. 1980. Light and electron microscopic studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen. *Vitis*, **19**: 321-337.
- Li, H. 1985. Étude de la relation entre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de Toni) et l'espece *Vitis vinifera* L.: variabilité de l'agent pathogène et de la sensibilité de l'hôte. Thèse doctoral, Université de Bordeaux, 1985.
- MELUC, D. 1991. Essai du mise en évidence de divers degrés de sensibilité au mildiou (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de Toni) chez *Vitis vinifera* L. Mémoire ENITA de Bordeaux, 80 p.
- RASKIN, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **43**: 439-463.
- RIEMANN, M., BÜCHE, C., KASSEMAYER, H.-H. 2002. Cytoskeletal responses during early development of the downy mildew of grapevine (*Plasmopara viticola*). *Protoplasma*, **219** (1-2): 13-22.
- RUMBOLZ, J., WIRTZ, S., KASSEMAYER, H.-H., GUGGENHEIM, R., SCHÄFER, E., BÜCHE, C. 2002. Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and light regulation. *Plant Biology*, **4**: 413-422.
- SAS INSTITUTE INC. (2000). SAS OnlineDoc, version 8. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, U.S.A.
- STAUDT, G., KASSEMAYER, H.-H., 1995. Evaluation of downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* **34**: 225-228.
- WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., PRADO, E., SCHNEIDER, C., COSTE, P., ONIMUS, C., DUMAS, V., BUTTERLIN, G., BOUQUET, A., MERDINOGLU, D. 2006. Resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*: genetic analysis and use of molecular markers for breeding. Proceedings of the 5th International workshop on grapevine downy mildew and powdery mildew. San Michele all'Adige, Italy, 18-23 June.
- UNGER, S., BÜCHE, C., BOSO, S., KASSEMAYER, H.-H. 2007. The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen-interactions. *Phytopathology*, **97** (7): 780-786.

(Recepción: 20 diciembre 2007)

(Aceptación: 1 julio 2008)