

DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS HONGOS RESPONSABLES DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA EN VID.

Duración: 2007-2009

Investigadores: Pedro Miguel Izquierdo Cañas, Juan Luís Chacón Vozmediano, Mónica Fernández González, Jesús Martínez Gascueña, Esteban García Romero, Raquel Torres Chica.

Objetivos:

- 1.- Comparar dos fungicidas alternativos al arsenito sódico para el control de la enfermedad de la yesca.
- 2.- Estudiar los efectos de los hongos en la calidad de las uvas.
- 3.- Aislar e identificar los hongos responsables de enfermedades de la madera.

Actividades realizadas

1. Ensayo con fungicidas alternativos al arsenito sódico.

La yesca está causada por hongos lignófagos, que se desarrollan en el seno de los tejidos lignificados de la vid, provocando su desorganización y posterior necrosis.

Durante el año 2007, en una parcela afectada de yesca de la variedad Airén, cultivada en vaso, se realizó un estudio con dos fungicidas alternativos al arsenito sódico, cuyo uso está actualmente prohibido debido al alto índice de toxicidad que presenta. El ensayo constaba de cuatro tratamientos, con cuatro repeticiones cada uno, distribuidos en cuatro bloques. Cada repetición tiene 75 cepas. En el primer tratamiento se aplicó sulfato de hidroquinoleína (Bilko) en concentración de 15 mL/L, en el segundo, el mismo producto pero en concentración de 25 mL/L, en el tercero un fungicida organico-cúprico de amplio espectro (Talosint) y el cuarto se dejó como testigo, sin tratar. La aplicación de los productos se realizó cuando la vid se encontraba en parada vegetativa.



Figura 1: Síntoma de apoplejía en planta de vid.

Al final del ciclo vegetativo se tomaron muestras de madera, tanto de plantas con síntomas de yesca como asintomáticas, en cada tratamiento. De estas muestras se cortaron pequeños fragmentos que fueron esterilizados superficialmente y sembrados en medio de cultivo Agar

Extracto de Malta (MEA) con 0,5 g/L de sulfato de estreptomicina. Las colonias fúngicas obtenidas se resembraron en Patata Dextrosa Agar (PDA) para aislar los diferentes tipos de hongos (Aroca et al. 2006).

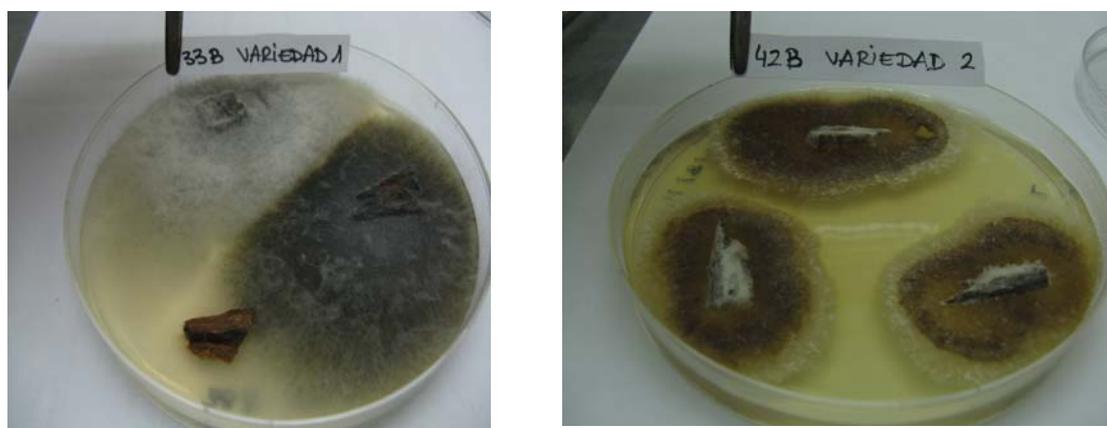


Figura 2. Hongos crecidos a partir de muestras de madera de vid.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la calidad de las uvas, en el momento óptimo de madurez tecnológica, se tomaron muestras de uva y se analizaron diferentes parámetros: grado Baumè, acidez total, pH, peso de 200 uvas, etc. Los hollejos y las semillas se separaron de la pulpa y se extrajeron con metanol: ácido fórmico:agua, determinándose las concentraciones de polifenoles totales, catequinas y taninos.

En el 2008 se ha realizado la identificación de los hongos aislados por dos métodos: morfológicamente y mediante técnicas de biología molecular (RFLP) (Fischer et al. 2003).

Resultados:

En la **Tabla 1** se recoge el porcentaje de cepas afectadas de yesca por tratamientos y bloques.

El mayor porcentaje de cepas afectadas con yesca se obtuvo para el testigo sin tratar del bloque B y el menor, para el tratamiento 2 del bloque D. El tratamiento más eficaz en el total de la parcela fue el fungicida orgánico-cúprico (T3), aunque con muy poca diferencia respecto al resto de tratamientos y el testigo.

Tabla 1: Porcentaje de cepas afectadas de yesca por tratamientos y bloques.

Tratamiento / Bloque	A	B	C	D	MEDIA
T1	24,32	22,67	23,29	28,89	24,79
T2	30,67	25,68	19,18	11,11	21,66
T3	23,88	20,75	25,35	11,62	20,40
T4	17,19	32,43	19,18	18,91	21,93
MEDIA	24,02	25,38	21,75	17,63	

T1. Bilko 15, T2. Bilko 25, T3. Talosint, T4. Testigo.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de los recuentos de los hongos obtenidos en cada uno de los tratamientos. Es de destacar que en el tratamiento T2 (cepas tanto sintomáticas como asintomáticas) es en el que se han observado los menores recuentos, así como un menor número de hongos distintos identificados según los perfiles PCR-RFLP.

Tabla 2: Aislamiento de hongos.

Tratamiento	Nº muestras afectadas	Nº hongos aislados	Hongos distintos PCR / RFLP
T1S	32 / 80	41	10
T1A	29 / 80	31	11
T2S	22 / 80	25	8
T2A	20 / 80	25	6
T3S	31 / 80	36	15
T3A	35 / 80	41	8
T4S	34 / 80	40	13
T4A	32 / 80	45	12
Total	235 / 640	284	

S: cepas con síntomas apreciables de yesca, A: cepas asintomáticas.

De entre todos los hongos aislados se han identificado una gran proporción hongos saprófitos, pertenecientes a los géneros *Alternaria ssp*, *Penicillium ssp* y *Aspergillus ssp*.

En cuanto a los hongos relacionados con la enfermedad de la yesca, se ha aislado e identificado *Botryosphaeria obtusa*. En la **Figura 2** se observa el perfil PCR-RFLP de las cepas identificadas como *Botryosphaeria obtusa* empleando las enzimas de restricción *Hpa II*, *Alu I* y *Mbo I* respectivamente.

En los tres tratamientos en los que se aplicó fungicida se ha identificado *Botryosphaeria obtusa* en las cepas sintomáticas, no aislándose por el contrario en las cepas asintomáticas. Este hongo sin embargo sí fue aislado, aunque en menor proporción, en las cepas asintomáticas del tratamiento T4 utilizado como testigo. Esto parece indicar que los fungicidas empleados pueden ejercer un efecto importante en el control de este tipo de hongos patógenos.

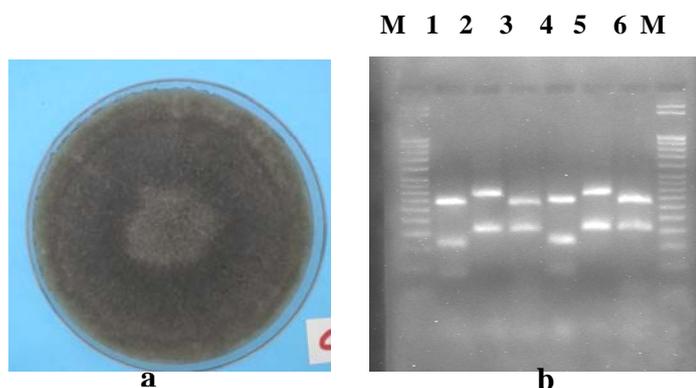


Figura 2: a) *Botryosphaeria obtusa* en PDA b) Perfiles de restricción de la región ITS1-5,8S-ITS2 rDNA obtenidos con HpaII, AluI y MboI para *Botryosphaeria obtusa* de referencia (CBS-119049) y aislada

En la **Tabla 3**, aparecen reflejados los valores medios de la composición y los parámetros de calidad de las uvas para los cuatro tratamientos. En las cepas que mostraban síntomas de yesca, el peso de las bayas ha sido significativamente menor en todos los tratamientos, debido a que las uvas procedían de pámpanos que presentaban un cierto grado de afectación. En los tratamientos donde se aplicó fungicida el tamaño de la uva fue menor que en el testigo, tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas. Lo mismo ocurrió con el número de semillas.

Tabla 3: Medias y desviaciones estándar de la composición y los parámetros de calidad de las uvas para los cuatro tratamientos.

Parámetro	T1S (n=4) Media ± DS	T1A (n=4) Media ± DS	T2S (n=4) Media ± DS	T2A (n=4) Media ± DS	T3S (n=4) Media ± DS	T3A (n=4) Media ± DS	T4S (n=4) Media ± DS	T4A (n=4) Media ± DS
Peso baya (g)	2,36 ^a ±0,17	3,04 ^{bc} ±0,07	2,23 ^a ±0,17	3,04 ^{bc} ±0,16	2,39 ^a ±0,75	3,00 ^{bc} ±0,1	2,47 ^{ab} ±0,2	3,17 ^c ±0,1
Nº pepitas/baya	1,59±0,17	1,85±0,11	1,62±0,32	1,74±0,15	1,55±0,41	1,78±0,02	1,75±0,23	1,88±0,11
% Hollejos/Peso baya (p/p)	16,77±2,1	15,80±2,8	14,92±1,39	13,93±1,78	14,99±2,3	13,95±1,90	14,69±3,0	13,87±2,5
% Pepitas/Peso baya (p/p)	3,03 ^b ±0,21	2,58 ^{ab} ±0,14	2,97 ^{ab} ±0,52	2,46 ^a ±0,17	2,93 ^{ab} ±0,4	2,43 ^a ±0,07	2,92 ^{ab} ±0,2	2,43 ^a ±0,14
°Baumé	12,05±0,3	12,01±0,68	12,06±1,66	11,92±0,94	11,81±0,8	12,69±0,59	12,52±1,44	12,93±0,8
pH	3,59±0,18	3,48±0,18	3,51±0,12	3,48±0,11	3,55±0,14	3,48±0,10	3,63±0,20	3,56±0,07
Acidez total (g/L)	5,21±0,39	5,81±0,74	6,07±0,26	5,86±0,55	5,49±0,50	5,32±0,57	5,52±0,08	5,26±0,76
Acido málico (g/L)	2,97±0,59	3,69±0,17	3,48±0,46	3,80±0,38	3,24±0,47	3,26±0,44	3,27±0,32	3,38±0,41
N asimilable (mg/L)	249 ^a ±50	215 ^a ±15	285 ^{ab} ±32	221 ^a ±12	256 ^a ±35	219 ^a ±16	336 ^b ±76	225 ^a ±32
Flavan-3-oles en hollejos ¹	126,0±20	111,0±25	116,5±13,5	106,3±6,7	126,5±31,1	99,6±20,7	148,7±27,9	109,0±20,
Taninos en hollejos ²	2,11±0,43	2,28±0,45	2,24±0,21	2,21±0,46	1,88±0,75	1,57±0,50	2,58±0,39	1,74±0,80
Polifenoles totales en hollejos ³	394,3 ^{ab} ±88	389,3 ^{ab} ±98	380,9 ^{ab} ±46	275,2 ^a ±47	414,9 ^{ab} ±94	269,1 ^a ±80	459,9 ^b ±96	283,3 ^a ±73
Flavan-3-oles en pepitas ¹	934,3±95,8	779,2±61,6	784,3±198,1	746,0±154	837,5±86,2	661,3±142	975,1±303	667,6±124
Taninos en pepitas ²	6,76±1,84	4,75±1,87	5,86±2,99	4,00±0,72	3,54±2,64	3,65±0,89	5,73±0,84	4,28±0,49
Polifenoles tot. en pepitas ³	1660±542	1222±332	1154±662	1146±307	1223±507	960±160	1298±394	1027±81

(^{a,b,c}) indican diferencias estadísticas significativas según el test de comparación múltiple de medias de Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). ¹: mg catequina/Kg de uva; ²: g/Kg de uva; ³: mg ácido gálico/Kg de uva.

El grado Baumé fue mayor en el testigo que en el resto de tratamientos. El pH de las uvas en las plantas con síntomas fue más elevado que en las otras, presentando valores más elevados en el tratamiento testigo que en el resto.

En lo que respecta a la acidez total y al contenido en ácido málico, que son dos de los principales parámetros de calidad en uvas blancas, el tratamiento 2 mostró los mejores resultados. También hubo diferencias significativas en el N asimilable, siendo las uvas de las cepas asintomáticas las de mayor contenido. En cuanto a los flavan-3-oles, tanto los procedentes de hollejos como los de semillas, se hallaron en mayor concentración en las uvas procedentes de cepas con síntomas que

en las asintomáticas, lo que indica una mayor tendencia a la oxidación de los vinos elaborados con aquellas. Idéntico comportamiento tuvieron los polifenoles totales.

CONCLUSIONES

Dada la naturaleza de los ensayos de campo, resultaría interesante confirmar en años sucesivos los resultados obtenidos, con el fin de confirmar la eficacia y los efectos de los productos estudiados. Aunque de los resultados obtenidos hasta ahora, puede afirmarse que ambos fungicidas ejercen un efecto muy limitado frente a la enfermedad de la yesca.

El fungicida organo-cúprico se ha mostrado como el más eficaz en lo que respecta al porcentaje de cepas afectadas, mientras que con el sulfato de hidroquinoleína, en dosis de 25 mL/L, se ha obtenido menor recuento de hongos y mayor contenido en ácido málico y acidez total en uvas.

2. Datos estadísticos de los hongos asociados a decaimientos de la vid, en la variedad Syrah.

Durante los años 2008 y 2009 han llegado al Departamento de Sanidad Vegetal del Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM) numerosas muestras que presentaban síntomas externos relacionados con enfermedades de madera de vid, y gran parte de ellas pertenecían a la variedad Syrah. Con estas muestras se ha realizado un trabajo en el que aparecen recogidos los resultados de los hongos patógenos identificados en muestras sintomáticas de la variedad *Syrah*, así como la relación entre las distintas partes de la planta, la edad del viñedo y el tipo de portainjerto.

Se han estudiado 29 muestras de vid de la variedad Syrah, de 3 a 7 años de edad, con síntomas típicos de decaimiento (mala brotación, entrenudos cortos, necrosis internervial de hojas, apoplejía, etc,...).

Se procedió al corte de la cepa en distintas partes: raíz, patrón, injerto y variedad. El aislamiento se realizó según la metodología descrita por Larignon y Dubos (1997). En los trozos de madera de cada una de las partes de la planta se eliminó la corteza y se obtuvieron discos transversales de aproximadamente 1 mm de grosor. Estos se desinfectaron superficialmente por inmersión en alcohol al 70% durante 1 o 2 minutos, dependiendo del grosor y se secaron al aire sobre papel de filtro estéril. Estos discos se sembraron en placas de Agar Extracto de Malta (MEAS) suplementado de 500 ppm de sulfato de estreptomina y fueron incubados a 25°C, en oscuridad. Las placas eran observadas diariamente para ver el crecimiento del micelio, que era transferido a placas Petri en PDA (Potato Dextrose Agar) para su aislamiento.

La identificación de los aislados a nivel de género y especie se realizó morfológicamente por la observación directa del cultivo bajo lupa y microscopio. La identificación mediante técnicas moleculares y por su esporulación se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia de Hongos Patógenos de Valencia.

De las 29 muestras estudiadas se ha confirmado la presencia de al menos un hongo patógeno en 23 de ellas, lo que representa un 79,3% de muestras afectadas. En la **Tabla 1** se presentan las muestras en las que a pesar de presentar síntomas externos de enfermedades de madera no se aisló ningún hongo patógeno en las distintas partes de la planta.

Tabla 1:

Muestra	Patrón	Localidad de origen	Provincia	Edad (años)
1	SO4	Santa Cruz de la Zarza	Toledo	7
2	110-R	Villanueva de la Jara	Cuenca	5
3	140-R	Manzanares	Ciudad Real	5

4	SO4	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	4
5	161.149C	Iniesta	Cuenca	3
6	110-R	Villacañas	Toledo	3

En la **Tabla 2** se exponen los hongos patógenos identificados en cada una de las partes de la planta en las 23 muestras que resultaron positivas, observándose que estos hongos patógenos se aíslan mayoritariamente en el patrón y el injerto (70 % de las muestras) y en menor proporción en la raíz y en la variedad. Esto sugiere que la propagación de estas enfermedades puede provenir de la plantas madres o durante el proceso de injerto y que son una fuente importante de inóculo de patógenos asociados con estas enfermedades de madera.

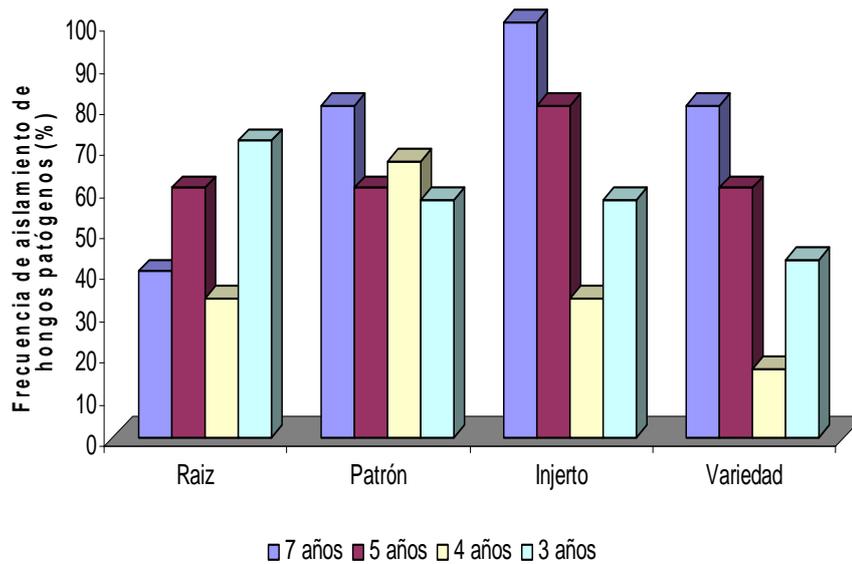
Tabla 2:

Muestra	Patrón	Localidad de origen	Provincia	Edad (años)	Hongos aislados			
					Raíz	Patrón	Zona del injerto	Zona de la variedad
1	SO4	Villacañas	Toledo	7	<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>Pa. chlamydospora</i>	<i>D. seriata</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>P. aleophilum</i>
2	SO4	Ocaña	Toledo	7		<i>P. aleophilum</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>P. aleophilum</i>
3	SO4	Ocaña	Toledo	7	<i>C. liriodendri</i>	<i>N. parvum</i> <i>P. aleophilum</i>	<i>P. aleophilum</i>	
4	140-RU	Santa Cruz Zarza	Toledo	7		<i>Cylindrocarpon spp.</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Pa. chlamydospora</i>
5	140-RU	Daimiel	Ciudad Real	7			<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>
6	110-R	Villacañas	Toledo	5	<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>P. aleophilum</i>		<i>D. seriata</i> <i>P. aleophilum</i>	<i>P. aleophilum</i>
7	110-R	Iniesta	Cuenca	5	<i>Cylindrocarpon spp.</i>	<i>D. seriata</i>		
8	110-R	La Guardia	Toledo	5	<i>Pa. chlamydospora</i>	<i>D. sarmentorum</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	
9	SO4	Las Pedroñeras	Cuenca	5		<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>P. aleophilum</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>
10	110-R	Villarrobledo	Albacete	5			<i>P. aleophilum</i>	<i>P. aleophilum</i>
11	110-R	Villagordo del Júcar	Cuenca	4				<i>N. parvum</i>
12	110-R	Iniesta	Cuenca	4		<i>Pa. chlamydospora</i>		
13	110-R	Iniesta	Cuenca	4	<i>Cylindrocarpon spp.</i> <i>Pa. chlamydospora</i>	<i>D. seriata</i>		
14	140-RU	Villacañas	Toledo	4	<i>Botryosphaeria ceae</i>		<i>P. aleophilum</i> <i>Pa. chlamydospora</i>	

15	SO4	Tarancón	Cuenca	4	<i>Phomopsis spp</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>P. aleophilum</i>		
16	41-B	El Peral	Cuenca	4	<i>P. aleophilum</i>			
17	Paulsen	Madrigueras	Toledo	3			<i>D. seriata</i>	
18	SO4	Corral de Almaguer	Toledo	3	<i>C. liriodendri</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>Cylindrocarpon spp</i>		
19	140-RU	Iniesta	Cuenca	3	<i>Cylindrocarpon spp</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i> <i>Pa. chlamydospora</i>		
20	SO4	Ocaña	Toledo	3		<i>N. parvum</i> <i>P. aleophilum</i> <i>Phomopsis spp</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	
21	140-RU	Ledaña	Cuenca	3	<i>D. seriata</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>
22	161-49	Villagarcía del Llano	Cuenca	3	<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>		
23	110-R	Argamasilla de Calatrava	Ciudad Real	3	<i>Cylindrocarpon spp</i>		<i>Botryosphaeria ceae</i>	<i>Botryosphaeria ceae</i>

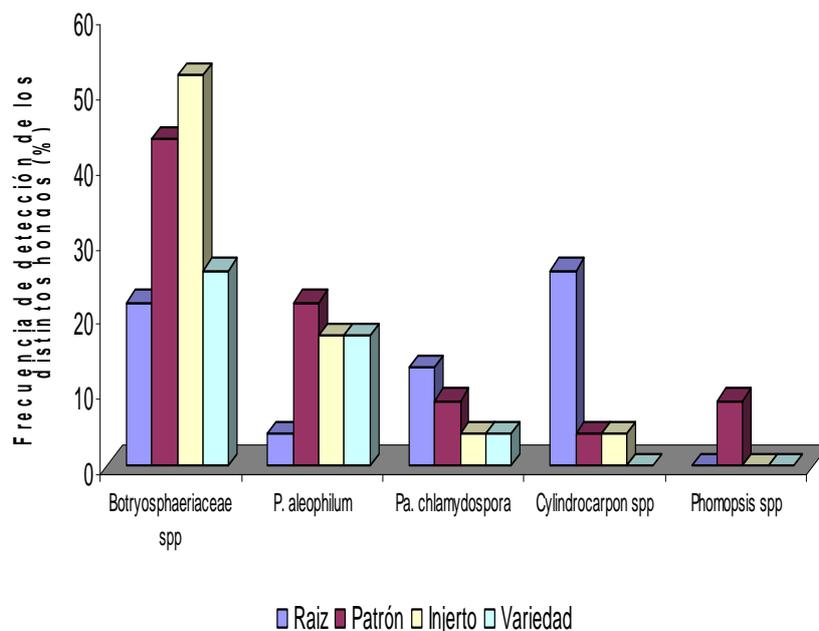
En algunas de las muestras se aislaron a la vez hongos patógenos en varias zonas de la planta, destacando en importancia las muestras en las que se identificaron hongos patógenos a la vez en raíz y patrón, raíz e injerto y patrón e injerto. Mucho más minoritarias fueron las muestras en las que se identificaron hongos patógenos a la vez en todas las partes de la planta (solo 2 muestras).

En la **Figura 1** se presenta el porcentaje de las distintas zonas afectadas de la planta en función de los años de las muestras, observándose como hecho más relevante que en las muestras de viña de más edad (7 y 5 años) se han aislado hongos patógenos en mayor proporción en el patrón, injerto y en la variedad. A nivel de raíz las muestras más afectadas fueron las correspondientes a los años 2003 y 2005 (5 y 3 años respectivamente). En el caso de las muestras con 4 años de edad estaban mayoritariamente afectadas a nivel de patrón y fueron las menos afectadas en raíz, injerto y variedad.



De todos los hongos patógenos aislados e identificados destaca en importancia *Botryosphaeriaceae* que fue aislado en un 90% de las muestras. En menor proporción a *Botryosphaeriaceae* han sido identificados *P. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* (50 y 35 % respectivamente de las muestras). *Cylindrocarpon spp.* también ha sido aislado e identificado en proporción similar a *Pa. chlamydospora*. En mucha menor proporción (10 % de las muestras) ha sido identificado *Phomopsis spp.*

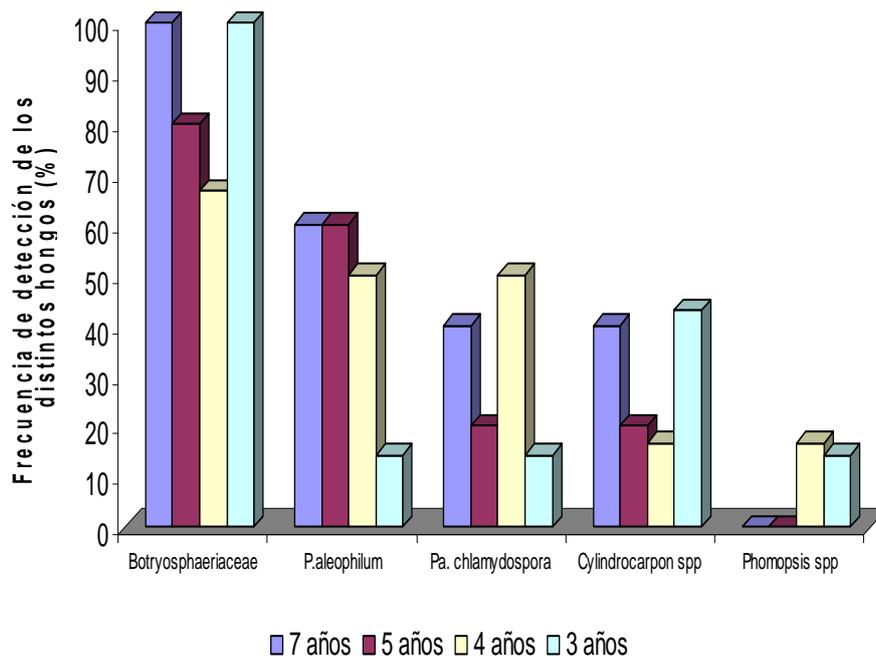
En la **Figura 2** se presentan los hongos patógenos que se han aislado en cada una de las zonas de la planta. *Botryosphaeriaceae* se ha aislado e identificado en todas las partes de la planta, pero se aísla mayoritariamente en el patrón y el injerto.



P.aleophilum también se ha aislado e identificado en todas las zonas de la planta aunque mayoritariamente en el patrón, el injerto y la variedad y de manera testimonial en la raíz. Por el contrario *Pa.chlamydospora* se ha aislado mayoritariamente en la raíz y el patrón, y en menor proporción en el injerto y la variedad. *Cylindrocarpon spp.* se ha aislado principalmente en la raíz y en mucha menor proporción en el patrón y el injerto, no aislándose en ninguna de las muestras en la variedad. *Phomopsis spp.* sólo se ha aislado en el patrón.

Entre las especies de *Botryosphaeriaceae* identificadas destaca en importancia *Diplodia seriata* que se aísla en todas las partes de la planta. Otros aislados de *Botryosphaeriaceae* han sido identificados como *Neofusicoccum parvum* y *Dothiorella sarmentorum*. Algunas de las cepas de *Cylindrocarpon spp.* han sido identificadas como *C. liriodendri* antes denominada *C. destructans*.

En la **Figura 3** se presentan expresados en porcentajes los géneros de hongos aislados en función de la edad de la planta. *Botryosphaeriaceae* se aisló en mayor proporción en todas las muestras independientemente de la edad de la viña. *P. aleophilum* se aisló en mayor proporción en las muestras de más edad y su presencia fue minoritaria en las muestras del año 2005 (3 años de edad). *Pa. chlamydospora* se aisló en mayor proporción en las muestras de 7 y 4 años de edad.



Cylindrocarpon spp. se identificó en mayor proporción tanto en las muestras de más edad, las de 7 años, como en las de menos edad, las de 3 años. *Phomopsis spp.* sólo se aisló en las muestras más jóvenes. Dentro del género *Botryosphaeriaceae* se ha identificado *D. seriata* en las muestras de todos los años. *N. parvum* fue aislado en muestras de todas las edades, mientras que *D. sarmentorum* en las muestras de más edad.

De las 23 muestras positivas, 20 de ellas pertenecían a tres portainjertos mayoritarios (SO4, 110-R y 140-RU). Las otras tres correspondían cada una a un portainjerto distinto (Paulsen, 41B y 161-49). Aunque por el número de muestras analizadas no se pueden extraer conclusiones generales, se ha observado que en los tres patrones mayoritarios se aísla principalmente *Botryosphaeriaceae* y *Cylindrocarpon spp.* en las raíces. *Phomopsis spp.* sólo se ha aislado en el

portainjerto SO4. *Pa. chlamydospora* se ha aislado en todos los portainjertos. *P.aleophilum* se aísla en gran proporción (el segundo en importancia después de *Botryosphaeriaceae*) en los portainjertos SO4 y 110-R mientras que se aísla ocasionalmente en las muestras del portainjerto 140-RU. Estos resultados permiten afirmar que no hay ningún tipo de portainjerto libre de patógenos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ángela López Martínez técnico ASV, Sertyman-DYMA la información suministrada y su ayuda técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Armengol J., Vicent A., Torné L., García-Figueres F., García-Jiménez J., 2001. Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 27: 137-151.
- Aroca, A., García-Figueres F., Bracamonte L., Luque J., Raposo R., 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 115: 195-202
- Fischer M., Kassemeyer H. H., 2003. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*. 42:3: 109-116.
- Graniti A., Surico G., Mugnai L., 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex of disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 1:16-20.
- Larignon P., Dubos B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103:147-157.
- Nagel C.W., Glories Y., 1991. Use a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42: 4: 364-366
- Porter L. J., Hrstich L.N., Chan B.G., 1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25: 223-230.
- Somers T.C., Evans M.E., 1976. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, Chemical age. *J.Sci. Food Agric*, 28: 279-287.