



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**  
DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES

Máster Universitario en Sanidad y Producción  
Vegetal

**Efecto de las cubiertas vegetales y las  
condiciones ambientales en la dispersión  
del inóculo aéreo de *Phaeomoniella  
chlamydospora***

Ana Belén Abelaira Ros

Tutor: Dr. Josep Armengol Forti

Cotutora: Dra. Mónica Berbegal Martínez

**Año académico: 2020/2021**

**Valencia, septiembre 2021**

## TÍTULO

Efecto de las cubiertas vegetales y las condiciones ambientales en la dispersión del inóculo de *Phaeomoniella chlamydospora*.

## RESUMEN

El patógeno *Phaeomoniella chlamydospora* es el agente causal de la enfermedad de Petri en plantas jóvenes de vid y de la Yesca en plantas adultas. Su forma de reproducción es asexual, dando lugar a conidios en conidióforos y también en picnidios. Éstos son dispersados principalmente por la lluvia y el viento, penetrando en la planta mediante las heridas de poda. En este estudio, se evalúa la efectividad de las cubiertas vegetales en viñedos actuando como barrera física a fin de evitar la dispersión del inóculo aéreo de *Pa. chlamydospora*, además de la influencia de las condiciones ambientales (temperatura, humedad y precipitación) sobre su dispersión. El experimento se localizó en un viñedo situado en Villar del Arzobispo (Valencia) y el periodo de estudio comprendió desde noviembre de 2019 hasta abril de 2020. Se instalaron capturadores de esporas en dos áreas de muestreo de las subparcelas con y sin cubierta vegetal. Además, se inocularon varios fragmentos de madera con el patógeno y fueron colocados en la zona central de cada área como fuente de inóculo. Los capturadores de esporas consistieron en cintas de plástico Melinex® impregnadas con silicona y fijadas en portaobjetos de vidrio, siendo situadas cerca de la fuente de inóculo y cerca de las plantas. Los capturadores se reemplazaron semanalmente y se llevaron al laboratorio donde se llevó a cabo la extracción de ADN de cada muestra para detectar el patógeno. Para ello se realizó una PCR anidada, realizando en la segunda ronda de la reacción una PCR a tiempo real (qPCR) utilizando cebadores específicos de *Pa. chlamydospora*. Con los datos obtenidos, se analizó el efecto de las cubiertas vegetales en la concentración de ADN del patógeno. Los resultados mostraron que el patógeno se detectó en un número mayor de semanas en los capturadores situados próximos a la fuente de inóculo. El análisis estadístico de los datos no mostró un efecto significativo de la presencia de cubierta vegetal en la concentración de ADN del patógeno detectado. Se observó un incremento en la concentración de ADN del patógeno detectado asociado a períodos de aumento de precipitaciones y con temperaturas medias registradas entre 10 y 20°C. Además, se observó una correlación positiva entre los resultados obtenidos y un modelo de predicción de la dispersión temporal del inóculo de *Pa. chlamydospora* previamente desarrollado.

**Palabras clave:** cubiertas vegetales, patógeno, enfermedades fúngicas de la madera de la vid, inóculo.

## TITLE

Effect of cover crops and environmental conditions on the inoculum dispersal of *Phaeomoniella chlamydospora*.

## ABSTRACT

The fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* causes Petri disease in young vine plants and Esca in adult plants. Its form of reproduction is asexual, giving rise to conidia in conidiophores and also in pycnidia. These are dispersed mainly by rain and wind, penetrating the plant through pruning wounds. In this study, the effectiveness of plant covers in vineyards is evaluated, acting as a physical barrier in order to avoid the dispersion of the aerial inoculum of *Pa. chlamydospora*, in addition to the influence of environmental conditions (temperature, humidity and rain events) on its dispersion. The experiment was located in a vineyard located in Villar del Arzobispo (Valencia) and the study period ranged from November 2019 to April 2020. Spore capturers were installed in two sampling areas of the subplots with and without plant cover. In addition, several wood fragments were inoculated with the pathogen and were placed in the central zone of each area as a source of inoculum. The spore catchers consisted of Melinex® plastic tapes impregnated with silicone and fixed on glass slides, being placed near the inoculum source and near the plants. The trappers were replaced weekly and taken to the laboratory where DNA extraction was carried out from each sample to detect the pathogen. To do this, a nested PCR was performed, performing in the second round of the reaction a real-time PCR (qPCR) using specific primers for *Pa. chlamydospora*. With the data obtained, the effect of plant covers on the DNA concentration of the pathogen was analyzed. The results showed that the pathogen was detected in a greater number of weeks in the trappers located close to the inoculum source. The statistical analysis of the data did not show a significant effect of the presence of vegetation cover on the DNA concentration of the detected pathogen. An increase in the DNA concentration of the detected pathogen associated with periods of increased rainfall and with average temperatures recorded between 10 and 20°C was observed. In addition, a positive correlation was observed between the results obtained and a previously developed model for predicting the temporal dispersion of the *Pa. chlamydospora* inoculum.

**Keywords:** cover crops, pathogen, fungal grapevine trunk diseases, inoculum.

**Autor:** Ana Belén Abelaira Ros

**Tutor:** Dr. Josep Armengol Forti

**Cotutor:** Dra. Mónica Berbegal Martínez

**Valencia, septiembre 2021**

Agradezco profundamente al director Josep Armengol Forti y codirectora Mónica Berbegal Martínez, por la oportunidad de realizar mi Trabajo Final de Máster y por brindarme su apoyo, dedicación y disponibilidad.

# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b> .....	8
I.1 Importancia del cultivo de la vid, superficie y producción.....	8
I.2. Enfermedades causadas por hongos de la madera de la vid.....	10
I.3 Fuentes de inóculo y vías de dispersión de las EFMV.....	12
I.4 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	13
I.5. Cubiertas vegetales en el cultivo de la vid.....	15
<b>II. Objetivos</b> .....	17
<b>III. Materiales y métodos</b> .....	18
III.1. Zona experimental y trampas de esporas .....	18
III.2 Protocolo de extracción de ADN.....	20
III.3. Detección mediante PCR anidada.....	20
III.3.1 PCR convencional (primera ronda) .....	20
III.3.2 PCR a tiempo real (segunda ronda).....	21
III.3.3 Recta de calibrado y obtención de la concentración en muestras.....	21
III.4 Análisis estadístico.....	22
<b>IV. Resultados y Discusión</b> .....	23
<b>V. Conclusiones</b> .....	29
<b>VI. Bibliografía</b> .....	30

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentración y volumen de los componentes añadidos para la preparación de master mix para la PCR.....	21
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de reacción para PCR.....	21
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de reacción para qPCR .....	21

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Sintomatología de las enfermedades. a) Podredumbre y puntos necróticos en el tronco de una planta afectada por Yesca. b) Coloración en las zonas internerviales de las hojas de una planta afectada por Yesca. c) Brazo con desarrollo retardado y brotaciones raquílicas en una planta afectada por Eutipiosis. d) Necrosis sectoriales duras en la madera de plantas afectadas por Eutipiosis y/o decaimiento por <i>Botryosphaeria</i> (MAGRAMA, 2014).....	12
<b>Figura 2.</b> Características morfológicas de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y su sinamorfo tipo <i>Phoma</i> . (a) Conidióforos y conidios de <i>Pa. chlamydospora</i> , (b) Conidióforos y conidios del sinamorfo tipo <i>Phoma</i> (Crous and Gams, 2000).....	14
<b>Figura 3.</b> Ciclo patológico de la enfermedad de Petri y de la Yesca causado por <i>Phaeoacremonium minimum</i> y <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , adaptado de (Gramaje <i>et al.</i> , 2015; Gramaje y Larignon, 2015).....	15
<b>Figura 4.</b> Parcela experimental localizada en Villar del Arzobispo.....	18
<b>Figura 5.</b> Diseño de las áreas de muestreo y localización de los capturadores de esporas. Los círculos verdes representan las plantas de vid, los cuadros negros representan las trampas de esporas y el rectángulo rojo central representa la localización de la fuente de inóculo de <i>Pa. chlamydospora</i> .....	19
<b>Figura 6.</b> Áreas de muestreo con (izquierda) y sin cubierta vegetal natural (derecha).....	19
<b>Figura 7.</b> Ubicación de los cebadores empleados en la PCR anidada (Gardes y Bruns, 1993; y Tegli <i>et al.</i> 2000).....	20
<b>Figura 8.</b> Concentración de ADN del patógeno detectada semanalmente en las trampas instaladas cerca de la fuente de inóculo a lo largo del periodo de estudio.....	23
<b>Figura 9.</b> Concentración de ADN del patógeno detectada semanalmente en las trampas instaladas próximas a las plantas a lo largo del periodo de estudio.....	24
<b>Figura 10.</b> Ratio del inóculo detectado a lo largo del periodo de estudio en las trampas próximas a la fuente de inóculo representado junto con los valores de las variables ambientales registradas.....	25
<b>Figura 11.</b> Ratio del inóculo detectado a lo largo del periodo de estudio en las trampas próximas a las plantas representado junto con los valores de las variables ambientales registradas.....	26
<b>Figura 12.</b> Proporción observada del ADN de <i>P. chlamydospora</i> de las trampas próximas a la fuente de inóculo sobre la predicción del modelo.....	27
<b>Figura 13.</b> Proporción observada del ADN de <i>P. chlamydospora</i> de las trampas próximas a las plantas sobre la predicción del modelo.....	28

# I. INTRODUCCIÓN

## **I.1 Importancia de la vid, superficie y producción.**

La viticultura y el desarrollo de nuevas variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) se han vinculado a la elaboración del vino. Gracias a los azúcares concentrados en los jugos de sus granos, la uva tiene tendencia a fermentar de forma natural debido a su gran contenido en levaduras. Los arqueólogos han descubierto que las vides del Cáucaso se remontan a hace unos 7.000 años. Por lo tanto, se puede decir que el primer viñedo probablemente se plantó entre los territorios actuales de Turquía, Georgia y Armenia. El clima y las condiciones del relieve en esta zona son particularmente propicios para el crecimiento de las vides, que alguna vez estuvieron en estado silvestre (García y Mudarra, 2008).

La vid se considera uno de los cultivos leñosos más plantados y económicamente importantes del mundo. Las uvas se pueden consumir como productos frescos o procesadas, como vino, zumo, mermelada, extracto de semilla de uva, vinagre, pasas y aceite de semilla de uva. Aproximadamente el 45% de las uvas no se prensa y el 55% restante se utiliza principalmente para la producción de vino. Teniendo en cuenta la parte comestible de varias frutas, las uvas son la segunda fruta de mayor consumo neto del mundo (FAO-OIV, 2016). En 2019, la superficie total de viñedo destinado a vino, uvas de mesa y pasas, incluidas las vides jóvenes aún no en producción, se estima en 7,4 Mill. ha (OIV, 2020).

En Asia Oriental, el número de viñedos chinos (855 mha), el segundo más grande del mundo después de España, está disminuyendo (OIV, 2020). En Estados Unidos, la superficie de viñedo se ha ido reduciendo progresivamente desde 2014, y su superficie en 2019 estimada es de 408 mha (OIV, 2020). En el hemisferio sur, América del Sur, la superficie de viñedos disminuyó por cuarto año consecutivo entre 2018 y 2019. La mayor superficie de viñedos es Argentina, disminuyendo hasta alcanzar los 215 mha (-3,0 mha / 2018). Asimismo, Chile ha reducido su superficie de viñedo, que se estima en 200 mha en 2019. Brasil también sigue reduciendo su superficie a 81 mha (-0,2 mha / 2018). La única excepción es Perú, que aumentó en 7,1 mha (+17% en 2018) alcanzando 48 mha (OIV, 2020). En Sudáfrica, se mantuvo estable en comparación con 2018, en 128 mha. En cuanto a Oceanía, la superficie de viñedos de Australia se mantuvo estable en 146 mha en 2019, y en Nueva Zelanda, la superficie creció un 1,6% hasta un récord de 39 mha (OIV, 2020). En el hemisferio norte, los viñedos de la Unión Europea (UE) se mantuvieron estables en general, manteniendo una superficie de 3,2 Mha.

Dentro de la Unión Europea, 2019 muestra un aumento en la superficie de viñedos en Francia (794 mha), Italia (708 mha), Portugal (195 mha) y Bulgaria (67 mha). Por otro lado, en comparación con 2018, España (966 mha), Hungría (69 mha) y Austria (48 mha) han disminuido ligeramente (OIV, 2020). En Europa Oriental, Rusia aumentó en 1,2 mha en 2019 a 95 mha. Turquía es el quinto viñedo más grande del mundo. Para 2019, su superficie de viñedo ha disminuido en 12,3 mha a una superficie total de 436 mha.

En España, en 2019, la superficie de viñedo para uva de vinificación española fue de 952.829 ha, de las cuales el 59% (-2,8%) pertenecía a secano y el 41% (+ 2,2%) a regadío. Castilla La Mancha (Castilla La Mancha) es la comunidad con mayor superficie, siendo el 49,1% (-1,2%) de la superficie total, seguida de Extremadura y Castilla y León.

Estos datos corresponden a las encuestas de superficie y rendimiento de cultivos de 2019 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, y fueron analizados por el Observatorio del Mercado del Vino de España (OeMv), confirmando que la superficie de viñedos de uva de transformación en España ha disminuido un -0,83% hasta 952.829 ha.

La comunidad autónoma con mayor superficie es Castilla-La Mancha con 468.027 ha (49,1%), seguida de Extremadura (85.785 ha y -0,7%), y Castilla y León (69.970 ha y + 2,3%) y las comunidades valencianas (60.927 ha) y - 0,6%), Cataluña (56.422 ha y + 0,8%) y La Rioja (52.789 ha y + 0,2%). Las comunidades restantes tienen menos de 40.000 ha de superficie.

De las 952.829 ha de viñedo en 2019, 566.303 ha son de secano y 386.525 ha son de regadío. Castilla-La Mancha posee la mayor superficie vitivinícola transformada de secano (230.512 ha, el 40,7%). En 2019, la superficie de regadío de Castilla La Mancha (237.515 ha) superó por primera vez a la de secano, un aumento del 2,3%, debido a una disminución del -4,6% en las zonas secas. Navarra y Baleares, también constan de una mayor superficie de regadío que secano. En 2019, las comunidades de Galicia y Valencia fueron las de mayor incremento de superficie de regadío, y Andalucía fue la comunidad con mayor descenso de superficie de regadío (-11,5%).

En cuanto al cultivo de secano, los mayores descensos en 2019 fueron Murcia (-8,7%), Comunidad Valenciana (-5,7%) y Galicia (-3,6%). Los de mayor crecimiento son Navarra (+ 10,8%) y Baleares (+ 5,4%).

En cuanto a producción, en Asia, los nuevos datos para China muestran una producción de vino de 8,3 Mill. hL en 2019, representando una disminución del 10 % con respecto a 2018. En EE. UU. se estima en 24,3 Mill. hL, una disminución del 2 % en comparación con 2018. En América del Sur, la tendencia general en 2019 es negativa respecto a 2018. Argentina (13,0 Mill. hL) y en Chile (12,0 Mill. hL) las producciones de vino de 2019 fueron inferiores con respecto a 2018 pero en líneas generales similares o incluso superiores que sus medias quinquenales, Brasil (2,0 Mill. hL) registró una notable reducción en su producción de vino en 2019 en más de 1 Mill. hL (-34 %/2018). En Sudáfrica, la producción de 2019 alcanzó los 9, Mill. Con respecto a Oceanía, la producción de vino de Australia registra una reducción por segundo año consecutivo, alcanzando los 12,0 Mill. hL en 2019 (-6 %/2018). En Nueva Zelanda la producción de vino fue de 3,0 Mill. hL en 2019, una ligera caída del 1 % con respecto a 2018 (OIV, 2020).

En la Unión Europea, la producción de vino en 2019 se estima en 156 mhL, un 14,4% menos que en 2018. Italia (47,5 mhL), Francia (42,1 mhL) y España (33,5 mhL) representan el 48% de la producción mundial de vino en 2019. En comparación con 2018, la producción de vino ha disminuido significativamente. Otros países con producción decreciente son Alemania (9,0 mhL, -12%), Rumanía (5,0 mhL, -4%), Austria (2,5 mhL, -10%) y Hungría (2,4 mhL, - 34%) y Grecia (1,9 mhL, -8%). Portugal es el país donde la producción de vino aumentó en 2019, alcanzando las 6,7 mhL (+ 10% / 2018) (OIV, 2020).

Según los datos de noviembre de INFOVI, los datos de producción temporal de la campaña para 2019/2020 reflejan la producción de vino y mosto de 37,2 mhL, de los cuales el 98,4% son productores de vino y mosto, y la producción media debe ser mayor o igual a 1.000 hL. La producción es un 26% menor que la temporada anterior y un 14%

menor que el nivel promedio de las cuatro temporadas anteriores. Al 30 de noviembre de 2019, de la producción total de vino y mosto, 33,5 mhL correspondían a vino y 3,7 mhL a mosto. La producción de vino es principalmente tinto y rosado (53%), el resto es blanco (MAPAMA, 2020).

La producción se ha localizado principalmente en Castilla-La Mancha (54%), Cataluña (9%), Extremadura (8%), Comunidad Valenciana (7%), Castilla y León (5%), La Rioja (5%) y Andalucía (3%) (MAPAMA, 2020).

Respecto a indicadores de consumo aparente, las salidas netas de vino al mercado interior declaradas al INFOVI por las bodegas y almacenistas en el año móvil del 1 de diciembre al 30 de noviembre asciende a 11 millones de hectólitros, un 8,2% superior al mismo periodo del año anterior. En los 4 meses de campaña estudiados, el incremento es del 6,8% respecto al mismo período de la campaña anterior (MAPAMA, 2020).

Entre el resto de los productos exportados al mercado interno, la producción de destinos declarados como vinagrería aumentó un 23,9% respecto al mismo período de la campaña anterior, y la producción declarada como destilería aumentó un 2,4% durante el mismo período (MAPAMA, 2020).

De agosto de 2019 a noviembre de 2019, el volumen de exportación fue de 7,2 mhL, un aumento del 9% con respecto al mismo período del año pasado (MAPAMA, 2020).

El INFOVI recoge también unas existencias de inicio de campaña de 36,8 mhL, un 24,3% superiores a las de la campaña anterior, y unas disponibilidades de vino en el mercado a 30 de noviembre de 2019 de 57,7 mhL, de un 7% inferiores a la misma fecha de la campaña anterior, fruto de la menor producción de esta campaña y del comportamiento del mercado (MAPAMA, 2020).

## **I.2 Enfermedades causadas por hongos de la madera de la vid.**

Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) se consideran actualmente como uno de los principales desafíos de la viticultura. Estas enfermedades causan graves daños a los viñedos todos los años y su incidencia está aumentando rápidamente en todos los países productores (De la Fuente, 2016).

Las EFMV están causadas por hongos patógenos que producen cambios internos en la madera de la vid por necrosis o pudrición seca. Estas enfermedades pueden reducir el desarrollo y la vitalidad de las plantas, la falta o el retraso de la brotación, el acortamiento de los entrenudos, clorosis y / o marchitamiento de las hojas y descomposición general, que eventualmente puede conducir a la muerte de la planta (MAGRAMA, 2014).

Tradicionalmente, las EFMV más conocidas han sido la yesca, tanto en su forma lenta, afectando a uno o dos brazos de la cepa, como en forma rápida, dando lugar a la muerte súbita o apoplejía, y la eutipiosis. Estas dos enfermedades se observaban tradicionalmente en plantas adultas (IVIA, 2017).

En la actualidad han aparecido síntomas muy parecidos a los de yesca, pero en los primeros años tras la plantación. Los síntomas más comunes observados son: plantas que no brotan, retraso en el desarrollo y escaso vigor, brotaciones raquílicas, hojas pequeñas, necrosis internas de la madera y agostamiento prematuro (IVIA, 2017).

Los estudios realizados en los últimos 25 años en todo el mundo a partir del análisis de la madera de plantas de vid afectadas por EFMV y en función de los hongos

encontrados, se pueden distinguir las siguientes enfermedades (Berstch et al., 2012; Gramaje et al., 2018):

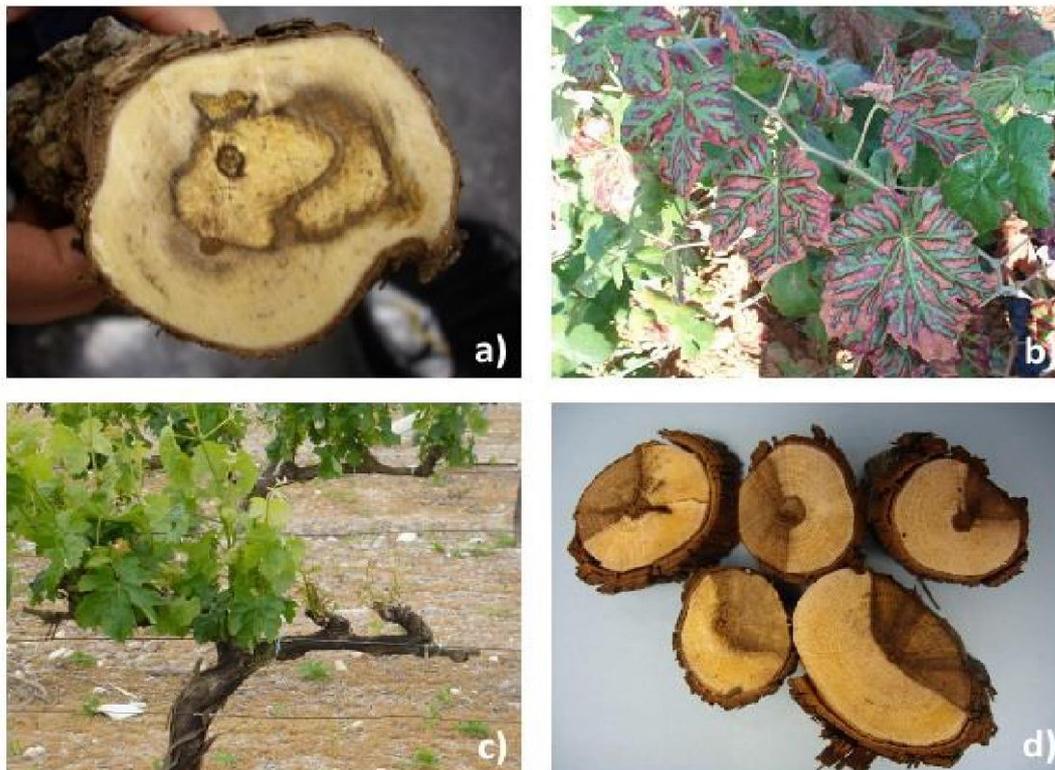
Yesca: (Figura 1 a y b) es una enfermedad ocasionada principalmente por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum*, causando síntomas como necrosis en la madera, y por diferentes especies de basidiomicetos, siendo el más común *Fomitiporia mediterranea* que provoca podredumbre seca y esponjosa. Además, algunas especies de *Phaeoacremonium* pueden estar involucradas en la etiología del complejo de la yesca. *Eutypa lata* y *Stereum hirsutum* pueden desempeñar una función en la enfermedad del complejo de la yesca (Bertsch et al., 2012). Dependiendo de la sintomatología se puede presentar de dos maneras: lenta y rápida o apopléjica. Si se presenta de forma lenta, en la zona internervial de las hojas aparecen coloraciones amarillentas en las variedades de uva blanca y rojizas en las tintas, que derivan en necrosis, pudiendo llegar a pasificarse los racimos prematuramente. Estos síntomas pueden manifestarse de forma crónica en algunas plantas y de forma totalmente errática en otras, mostrándolos un año, pero no al siguiente. La forma apopléjica produce la muerte repentina de la planta, generalmente en los meses de verano (MAGRAMA, 2014).

Eutipiosis: (Figura 1 c) *Eutypa lata* es el agente causal de la eutipiosis, y también puede estar asociado a procesos de degradación de la madera de la yesca. Los síntomas se caracterizan por brotes mal desarrollados con entrenudos cortos, y hojas pequeñas, curvadas, cloróticas y con necrosis marginal y tejido internervial muerto. La expresión de estos síntomas foliares se da principalmente durante la primavera. Se secan muchas flores antes de la apertura, y en los brotes infectados normalmente se produce un retraso en el desarrollo de bayas y además son pequeñas (Bertsch et al., 2012).

Enfermedad de Petri: causada por hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium*, por las especies *Pa. chlamydospora* y *Cadophora* spp. (Gramaje et al., 2018). Esta enfermedad afecta a la zona basal de plantas jóvenes, colonizando los tejidos xilemáticos o vasos conductores. Si se realiza un corte transversal en la madera, se observan punteaduras necróticas formando un anillo alrededor de la médula que corresponden a los vasos dañados y en ocasiones aparece exudación gomosa. Los síntomas son retraso vegetativo y poco vigor (IVIA, 2017), crecimiento lento y débil, brotes con cortos entrenudos, disminución de masa foliar, clorosis internervial en las hojas seguido de necrosis y defoliación temprana; además, se observa escaso desarrollo de las raíces y aparición de lesiones necróticas en la zona radicular y en ocasiones, la muerte. Otro síntoma es el fracaso de los injertos en el primer año (Romero y Cadenas, 2013).

Pie negro: Esta enfermedad está causada por hongos del suelo de los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria* y *Neonectria* (Gramaje et al., 2018). Afecta a la zona basal de plantas jóvenes y raíces. Los síntomas observados son lesiones necróticas y reducción de la masa radicular. También se observa retraso en el desarrollo y escaso vigor en la parte aérea (IVIA, 2017).

Decaimiento por Botryosphaeria: (Figura 1 d) especies fúngicas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae como *Diplodia seriata* o *Neofusicoccum parvum* pueden causar esta enfermedad. Las plantas afectadas presentan ramas muertas con desarrollo vegetativo débil, que a veces sobreviven, pero con un bajo porcentaje de brotación. El principal síntoma en el tronco de la planta es la necrosis sectorial con decoloración vascular. Algunos cultivares pueden ser más sensibles a esta enfermedad (Cabernet, Sauvignon, Ugni-Blanc, etc.) que otros (Merlot) (De la Fuente, 2016).



**Figura 1.** Sintomatología de las enfermedades. a) Podredumbre y puntos necróticos en el tronco de una planta afectada por Yesca. b) Coloración en las zonas internerviales de las hojas de una planta afectada por Yesca. c) Brazo con desarrollo retardado y brotaciones raquílicas en una planta afectada por Eutipiosis. d) Necrosis sectoriales duras en la madera de plantas afectadas por Eutipiosis y/o decaimiento por *Botryosphaeria* (MAGRAMA, 2014).

### **I.3. Fuentes de inóculo y vías de dispersión de las EFMV.**

Los patógenos causantes de las EFMV se han encontrado en plantas madre y en plantas en producción de viveros, tanto injertos como barbados. Estos hongos han sido detectados tanto en época de crecimiento (primavera – verano) como en latencia (otoño – invierno), y han sido encontrados también en restos de poda y, sobre todo, en cepas muertas (Agustí-Brisach *et al.*, 2015).

#### **Fuentes de inóculo**

Suelo. *Pa. chlamydospora* posee la capacidad para producir clamidosporas, que son una estructura de resistencia. Por ello es un patógeno vinculado al suelo. Este hongo y otras especies del género *Phaeoacremonium* asociadas a las EFMV, también han sido detectadas en el suelo mediante técnicas moleculares (Gramaje y Armengol, 2011).

Campos de plantas madre. En ocasiones, la presencia de patógenos asociados al pie negro y la enfermedad de Petri, así como especies de hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* en las raíces de plantas de vid producidas en vivero, no se relacionan con los síntomas externos que muestra la planta. Si la presencia se confirma en plantas asintomáticas, se podría decir que el hongo puede permanecer en estado latente hasta que las viñas sufran déficit hídrico, ataque de nematodos o estrés, con los que la planta mostrará síntomas de enfermedad. Así se demuestra la alta capacidad

como fuente de inóculo que poseen las plantas madre en el proceso de propagación vegetal (Gramaje y Armengol, 2011).

Restos de poda. La mayoría de los patógenos que ocasionan EFMV sobreviven en los restos de poda, debido a que éstos pueden albergar gran cantidad de cuerpos fructíferos de distintas especies de hongos como *Diplodia seriata*, *Cryptovalsa ampelina*, etc. Por esta razón, es necesario eliminar los restos vegetales después de la poda y partes enfermas de las plantas de la parcela, con el fin de evitar la esporulación de patógenos aumentando el riesgo de infección después de la poda (Luque *et al.*, 2014).

### **Dispersión**

Existen diversas formas de dispersión de los hongos asociados a las EFMV entre las que destacan:

Viento. Es la forma principal de dispersión de los hongos cuyas esporas se transportan a grandes distancias hasta alcanzar plantas susceptibles causando su infección (Elena y Luque, 2016).

Lluvia. La dispersión de ciertos hongos es generada por la salpicadura de esporas que produce la lluvia o el riego por aspersión (MAGRAMA, 2014).

Herramientas de poda. Es necesaria la desinfección regular de las herramientas por el personal puesto que son un gran foco de infección para las plantas de vid (Gramaje y Di Marco, 2015).

Artrópodos. Se han encontrado especies de *Phaeoacreomonium* en larvas de coleópteros, por lo que éstos pueden ser considerados vectores de hongos que dan lugar a la infección de plantas sanas (Kubátová *et al.*, 2004; Moyo *et al.*, 2014).

### **1.4 Phaeomoniella chlamydospora.**

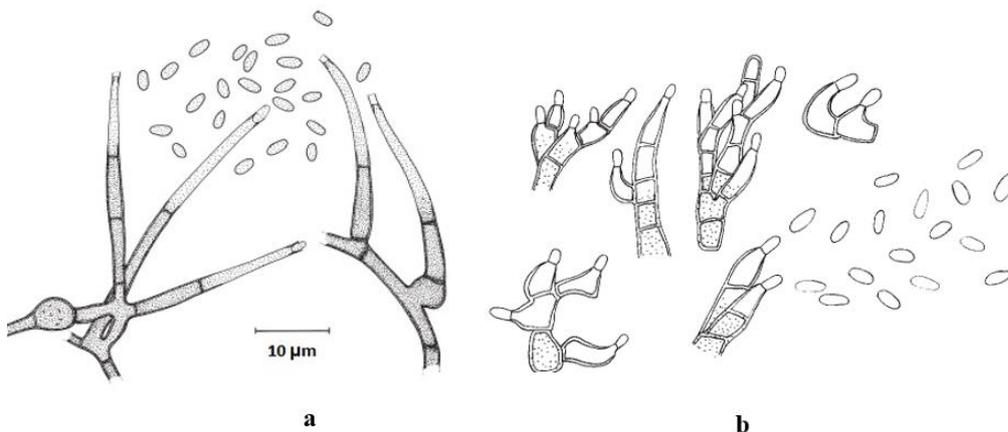
*Phaeomoniella chlamydospora* es considerado un patógeno fúngico asociado a las EFMV debido a que está relacionado con la enfermedad de Petri y la Yesca. Este hongo genera un decaimiento en plantas de vid maduras y jóvenes. Es un hongo mitospórico, con teleomorfo (reproducción sexual) no conocido, que posee conidios rectos y pigmentados, células conidiógenas con coloración marrón verdosa, crecimiento similar en colonias jóvenes a las levaduras, y produce estructuras similares a clamidosporas en cultivo (Crous y Gams, 2000).

El micelio es ramificado, septado y puede encontrarse de forma individual o hasta diez hebras con paredes marrones verdosas y septos más oscuros siendo más claros hacia la región conidiógena. Los conidióforos son cilíndricos, simples, erectos y constan en el ápice con una célula alargada, con base de pared gruesa y tonalidad marrón verdosa volviéndose más delgada y clara hacia el ápice. Además, los conidióforos tienen medidas entre 12-70  $\mu\text{m}$  de alto y 1.5-4.0  $\mu\text{m}$  de ancho. Estos darán lugar a conidios que se formarán en el ápice de las células conidiógenas con forma elíptica a ovada, rectas y agregadas en fascículos, cabezas viscosas y redondas (Crous y Gams, 2000).

Las células conidiógenas son solitarias, monofalídicas, alargadas-ampuliformes a lageniformes o subcilíndricas y constan de un collarite terminal, con forma de embudo y estrecho, de 0.5 largo a 2.0  $\mu\text{m}$  ancho (Figura 2a) (Crous y Gams, 2000).

El sinanamorfo tipo *Phoma* tiene cuerpos fructíferos que pueden medir hasta 70 µm de diámetro, de color marrón, globosos, picnidiales. Los conidióforos tienen un tono marrón claro, multiseptados, de forma subcilíndrica y los conidios que se descargan de los picnidios poseen una forma oblongo-elipsoidal a ovada, permanentemente rectos e hialinos (Figura 2b) (Crous y Gams, 2000).

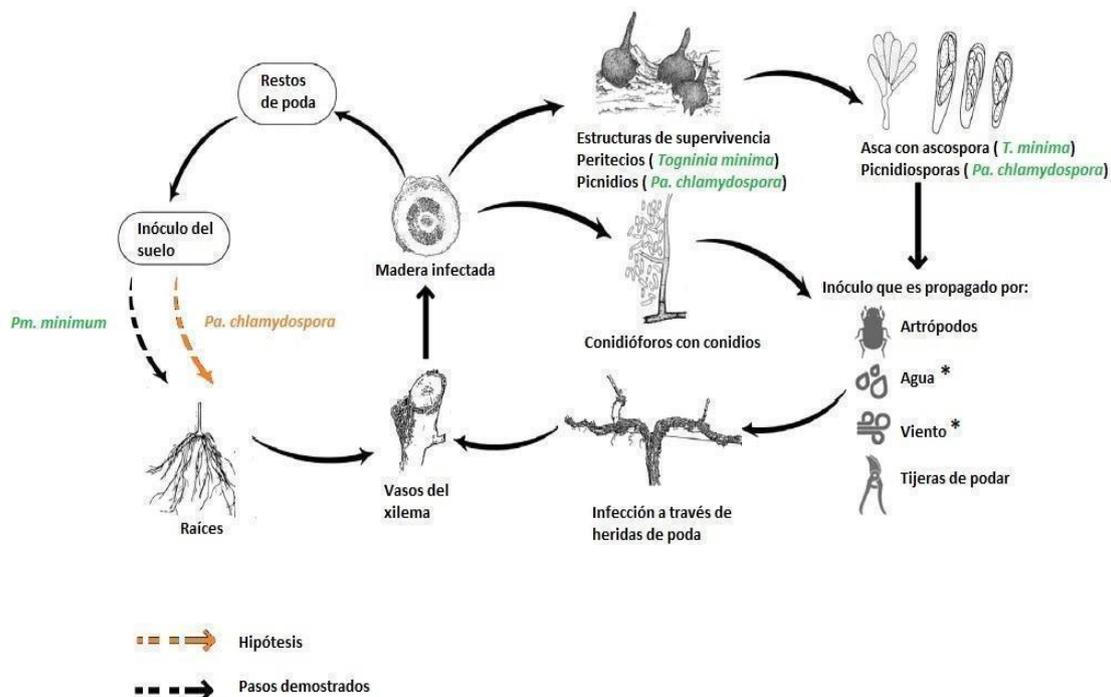
El crecimiento de este hongo en medio de cultivo agar de malta (MEA) presenta una colonia que va de una tonalidad gris-olivácea a olivácea-negra. Las temperaturas ideales para su crecimiento son de 15 ° C (mínima), 25 ° C (óptima) y por debajo de 35 ° C (máxima). La colonia puede llegar a alcanzar un radio de 5-6 mm a 25 ° C en la oscuridad después de 8 días (Crous y Gams, 2000).



**Figura 2.** Características morfológicas de *Phaeomoniella chlamydospora* y su sinanamorfo tipo *Phoma*. (a) Conidióforos y conidios de *Pa. chlamydospora*, (b) Conidióforos y conidios del sinamorfo tipo *Phoma* (Crous and Gams, 2000).

Este patógeno habita como endófito en la zona xilemática de la planta, donde da lugar a los conidios que se transportarán mediante la savia por toda la planta. El hongo es capaz de germinar y penetrar en las paredes celulares del parénquima vascular, dando lugar a tejidos necrosados (Gramaje *et al.*, 2015).

En invierno se puede encontrar en grietas profundas de troncos, brazos y pulgares y en restos de poda. También puede infectar las plantas a través de la zona radicular puesto que es capaz de sobrevivir en el suelo (Gramaje *et al.*, 2015). En primavera, con el aumento de la temperatura del suelo y el aire, y el crecimiento vigoroso de las viñas, este hongo comienza a esporular. Los picnidios de *Pa. chlamydospora* producen conidios que se pueden dispersar mediante el viento, herramientas de poda, agua e insectos (Gramaje *et al.*, 2015) (Figura 3). Debido a que las infecciones de las plantas se dan, la gran mayoría, tras la poda, se han realizado numerosos estudios sobre los momentos de mayor susceptibilidad de la planta a infecciones una vez hecha la poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2015). Según Luque *et al.*, 2014, la infección de la mayoría de los sarmientos tiene lugar tras la poda de febrero, pero el porcentaje es menor si ésta se realiza en noviembre. Aun así, para minimizar infecciones, debe estudiarse la zona previamente para prever y evitar riesgos.



**Figura 3.** Ciclo patológico de la enfermedad de Petri y de la Yesca causado por *Phaeoacremonium minimum* y *Phaeomoniella chlamydospora*, adaptado de (Gramaje *et al.*, 2015; Gramaje y Larignon, 2015).

## I.5 Cubiertas vegetales en el cultivo de la vid.

Se han probado gran variedad de métodos de control, ya sean químicos, biológicos, métodos de saneamiento o moléculas naturales para prevenir las EFMV. Sin embargo, como práctica de cultivo, se sabe poco sobre la dispersión de los hongos asociados a las EFMV en los viñedos empleando cultivos de cobertura como método de control (Bertsch *et al.*, 2012).

El uso de una cubierta vegetal puede aportar ventajas agronómicas y medioambientales. A nivel de suelo genera una mayor protección contra la erosión, mejora su estructura, facilita el tránsito de maquinaria sobre todo en épocas lluviosas, reduce la formación de costra, proporciona materia orgánica al suelo, activa la vida microbiana y ejerce control en el crecimiento de malas hierbas. A nivel de planta actúa controlando el vigor y el rendimiento del cultivo y además ayuda a mejorar la calidad del fruto, en cuanto a sanidad y composición (Ramírez y Lasheras, 2015).

En el cultivo de la vid, si se emplean especies de plantas que se adapten bien a cultivos de cobertura, el rendimiento puede mejorar o mantenerse en algunos suelos en comparación con el usual tratamiento de tierra desnuda / herbicida, puede minimizarse la aplicación de herbicidas (como el glifosato) y pueden disminuir los costos de manejo significativamente, se produce el aumento del carbono del suelo cuando se cultivan leguminosas y pastos debajo de la vid, mejorando así la estructura del suelo y la filtración de agua (Penfold y Howie, 2019).

Diversos estudios destacan los efectos biofumigantes de los cultivos de *Brassicaceae* (mostazas / crucíferas) que han demostrado la eliminación de patógenos transmitidos por el suelo. Otros cultivos de cobertura pueden reducir enfermedades cuyo medio de

transmisión es el suelo por albergar microorganismos beneficiosos y antagonistas, como es el caso de las leguminosas y las gramíneas. Estas plantas proporcionan un incentivo para implementar la diversidad de cultivos de cobertura en viñedos como método de gestión para enfermedades transmitidas por el suelo. Además, la variedad vegetal ayuda al aumento de diversidad microbiana del suelo, la biomasa y la actividad a través de la exudación de las raíces, lo que puede favorecer los servicios al ecosistema (Richards et al, 2020).

Una comunidad microbiana diversa es capaz de generar una amplia gama de funciones, pero no existe una "composición óptima" de estos microbios saludables, solo se ha demostrado que ciertos grupos microbianos mejoran la salud del suelo. Por ejemplo, los hongos micorrízicos arbusculares mejoran la producción de cultivos por proteger las plantas hospedantes de patógenos, mejoran la absorción de nutrientes y aumentan la tolerancia de las plantas hospedadoras a los factores ambientales adversos como la sequía. Estudios demuestran que los cultivos de cobertura, y en concreto especies de gramíneas como la avena (*Avena sativa* L.), el centeno (*Secale cereale* L.), y el trigo de invierno (*Triticum aestivum* L.h), pueden aumentar los hongos micorrízicos mejorando la salud de los suelos agrícolas. Un indicador importante de la salud del suelo es la materia orgánica del suelo, favoreciendo a los ciclos de nutrientes, estabilidad de agregados y capacidad de retención de agua (Finney et al, 2017).

Respecto a la sanidad vegetal, las cubiertas pueden contribuir al control de plagas; las cubiertas vegetales se pueden utilizar como reservorios de la fauna auxiliar, la cual mantendrá equilibrada la población plaga en el cultivo (Ramírez y Lasheras, 2015).

Los aspectos negativos del uso de la cubierta vegetal podrían ser la competencia excesiva por los nutrientes y el agua, además del aumento del riesgo de heladas cuando se realiza un mal manejo de las mismas (Ramírez y Lasheras, 2015).

El régimen hídrico existente y la capacidad de reserva hídrica del suelo son factores que influyen en la viabilidad de la cubierta vegetal para el cultivo de vid y, en función del momento y el lugar donde se implanta puede generar una mayor o menor competencia por el agua y por tanto la cepa puede verse o no afectada. Este déficit hídrico podría causar una disminución de la actividad fotosintética de la planta, dando lugar a un escaso desarrollo foliar. También, si se da a partir del cambio de color del grano podría afectar a su madurez, ya que afectaría a la síntesis de azúcares y a los componentes esenciales de la calidad: aromas y compuestos polifenólicos. En casos extremos, podría afectar a la perennidad de las cepas. Además, en determinadas circunstancias especiales (como la aparición de heladas), la recuperación de las cepas con cubierta vegetal será más lenta que la gestión mediante laboreo, lo que requiere el apoyo de otras técnicas de plantación para conseguir la recuperación del viñedo (Ramírez y Lasheras, 2015).

## II.OBJETIVOS

El objetivo de este estudio será investigar la eficacia de las cubiertas vegetales en viñedos actuando como barrera física a fin de evitar la dispersión del inóculo aéreo de *Phaeomoniella chlamydospora*, además de la influencia de las condiciones ambientales (temperatura, humedad y precipitación) sobre la dispersión de este hongo patógeno. Para ello se cuantificará el inóculo de *Pa. chlamydospora* mediante trampas de esporas instaladas en la parcela de estudio y se relacionarán los valores de las capturas con los datos de variables climáticas (temperatura, HR medio y precipitación), tomados de una estación meteorológica situada en la parcela experimental. El objetivo final será mejorar el manejo de las enfermedades de la madera de la vid.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.1 Parcela experimental y trampas de esporas

La parcela experimental estaba ubicada en Villar del Arzobispo, comarca de Los Serranos en la Comunidad Valenciana, España (latitud: 39 ° 40 'N, longitud 0° 47' W) con un clima mediterráneo de verano caluroso (Figura 4). Las características del portainjerto y variedad de la vid eran las siguientes: portainjerto: 110 Richter / variedad: Cabernet Sauvignon. Las plantas se encontraban en sistema globet con marco de plantación de 3,5 x 2 m. La parcela se cultivaba en ecológico con cubierta vegetal natural que consistía principalmente en *Cynodon dactylon*, *Amaranthus sp.* y *Conyza canadensis*.

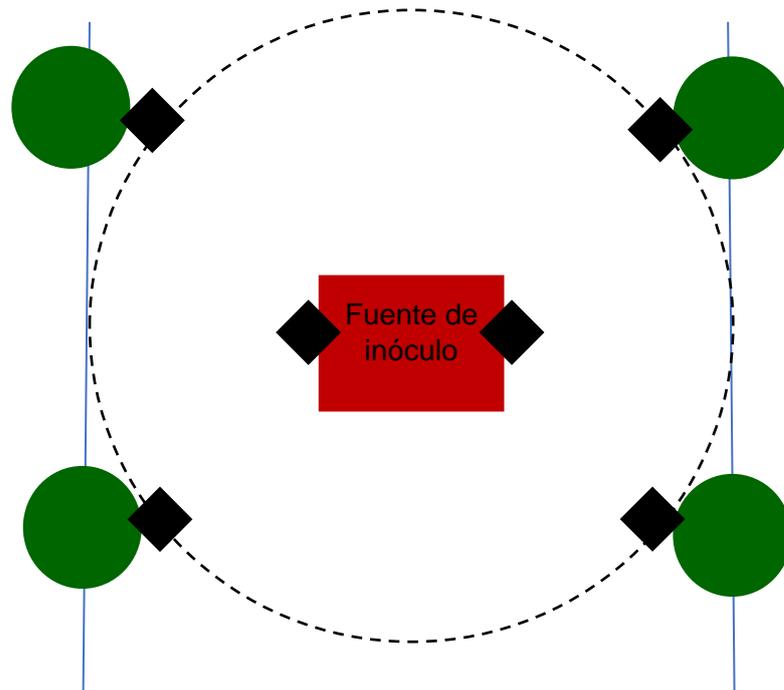


**Figura 4.** Parcela experimental localizada en Villar del Arzobispo.

El diseño de las áreas de muestreo se muestra en la Figura 5, que representa con un cuadrado rojo el lugar donde se situó la fuente de inóculo. El inóculo consistió en 0,5 kg de fragmentos de madera de viña con una longitud de 10 cm aproximadamente previamente esterilizados e inoculados con una suspensión de conidios de *Pa. chlamydospora* ( $10^6$  conidios / ml). Estos fragmentos fueron cubiertos con una malla metálica fijada en el suelo que permitía la dispersión del inóculo por la lluvia y el viento.

En cada área de muestreo se instalaron capturadores para la captura de esporas siguiendo el diseño que indica la Figura 5. Los capturadores de esporas consistían en una cinta de plástico Melinex® con unas dimensiones de 52 mm x 70 mm (Burkard Scientific Ltd., Reino Unido), cubierta con silicona y posteriormente adherida a un portaobjetos de vidrio (25 mm x 76 mm). Como muestra la Figura 5, los capturadores se colocaron en cuatro áreas de muestreo denominadas A y D las que presentaban cubierta vegetal natural y B y C las que no presentaban cubierta vegetal. Por unidad de muestreo se analizaron un total de 6 portaobjetos: 2 ubicados a izquierda y derecha cerca de la fuente de inóculo y a una altura de 10 cm por encima del suelo y 4 portaobjetos fijados en la madera de las plantas de vid, orientados hacia la fuente de inóculo y a 45 ° de la superficie el suelo (Figura. 6). Estos capturadores fueron recogidos

y reemplazados cada semana desde el 28 de noviembre de 2019 hasta el 30 de abril de 2020.



**Figura 5.** Diseño de las áreas de muestreo y localización de los capturadores de esporas. Los círculos verdes representan las plantas de vid, los cuadros negros representan los de esporas y el rectángulo rojo central representa la localización de la fuente de inóculo de *Pa. chlamydospora*.



**Figura 6.** Áreas de muestreo con (izquierda) y sin cubierta vegetal natural (derecha).

### **III. 2 Protocolo de extracción de ADN**

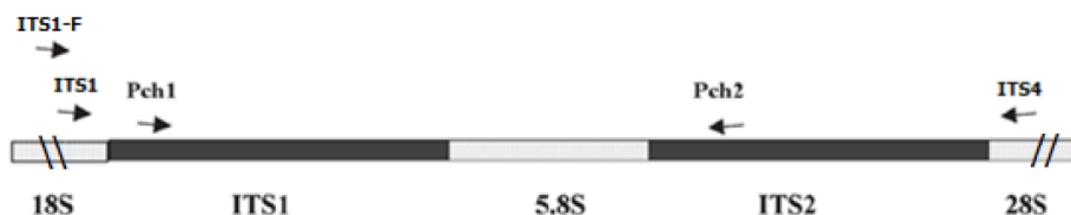
Para realizar la extracción del ADN, en primer lugar, se retiraron las cintas adheridas al portaobjetos y se cortaron en varios fragmentos utilizando tijeras previamente esterilizadas con alcohol. Una vez cortadas se introdujeron en tubos con tapón de rosca de 2 ml. En cada tubo se añadió una matriz de lisis consistente en 1 g de perlas cerámicas de 0,5 mm de diámetro (Zymo Research, CA, EE. UU.) y 650 µl de tampón de extracción P1 (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit, GA, Reino Unido). La matriz de lisis facilitó que las partículas adheridas a la cinta del captador se separaran y la ruptura de las paredes celulares durante el proceso de homogeneización en un equipo Fastprep® (MP Biomedicals, California, EE. UU.) a 50 Hz durante 30 segundos. Una vez completada la homogeneización se procedió a la incubación de los tubos durante 5 min a 65 °C, realizando una agitación en Vortex a mitad de período. Posteriormente, se añadieron 140 µl del tampón P2 (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y se agitaron durante varios segundos. Se procedió a la centrifugación de la mezcla a 13.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante (~ 650 µl) se vertió a un tubo de 1,5 ml con 600 µl de EtOH (absoluto) y 300 µl del tampón P3 (kit EZNA Plant Miniprep Kit) para precipitar el ADN. La mezcla se agitó durante segundos, poniéndola a continuación en las columnas con filtro proporcionadas por el kit de extracción y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 min para que el ADN quedara retenido al filtro. Después se purificó el ADN realizando dos lavados con 650 µl de tampón de lavado de ADN (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y una vez se dejó centrifugar sin añadir tampón durante 1 min a 13.000 rpm antes de transferirlo a nuevos tubos de 1,5 ml. Finalmente, se agregó 50 µl de tampón de elución (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y se centrifugó durante 1 min para obtener el ADN final y se almacenó a -20 °C.

### **III.3 Detección mediante PCR anidada**

Se siguió un protocolo de PCR anidada para obtener una mayor sensibilidad en la detección de *Pa. chlamydospora* a partir de los capturadores de esporas. La PCR anidada consistió en una primera ronda de PCR convencional con el ADN extraído de los capturadores de esporas para posteriormente realizar una segunda ronda de qPCR con el producto de la primera ronda (Arizmendi, 2015).

#### **III.3.1 PCR convencional (primera ronda)**

Para la primera ronda de PCR anidada, se utilizó el cebador universal ITS1-F, que amplificó la secuencia de la región 18S del ADNr (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') y el cebador específico Pch2 de *Pa. chlamydospora*, el cual amplificó una secuencia de la región ITS2 del ADNr (3'-TGAAAGTTGATATGGACCC-5') (Figura 7).



**Figura 7.** Ubicación de los cebadores empleados en la PCR anidada (Gardes y Bruns, 1993; y Tegli *et al.* 2000).

Para cada reacción, fue utilizada una alícuota de 23 µl del "master mix" (Tabla 1) y 2 µl de ADN molde para un volumen total de 25 µl. Se incluyeron controles negativos sin ADN añadido.

**Tabla 1.** Concentración y volumen de los componentes añadidos para la preparación de master mix para la PCR.

Componente	Concentración final	Volumen
SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (1x)	1	12,5 µl
ITS1-F o Pch1 (µM)	0,4 µM	1 µl
Pch2 (µM)	0,4 µM	1 µl
H <sub>2</sub> O		8,5 µl

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA, USA) bajo las siguientes condiciones (Tabla 2):

**Tabla 2.** Condiciones de reacción para PCR.

Fase		Condiciones
Desnaturalización inicial		95°C 1 min
Amplificación 20 ciclos	Desnaturalización	95 °C 5 s
	Alineamiento	55 °C 30 s
	Elongación	72 °C 40 s
Extensión final		72 °C 10 min

### III.3.2 PCR a tiempo real (segunda ronda)

Para la segunda ronda de PCR anidada, se utilizaron cebadores específicos de *Pa. chlamydospora* Pch2 y Pch1, siendo (5'-CTCCAACCCTTTGTTTATC-3 ') la secuencia de este último cebador. Se utilizaron 2 µl de los productos de la primera PCR como ADN molde y se añadió una alícuota de 23 µl de la "master mix" para obtener un volumen total de 25 µl con las concentraciones finales indicadas en la Tabla 3. Además, se añadieron varias reacciones sin ADN como control negativo. Para cada producto de PCR, se realizaron dos réplicas y cada reacción se colocó en tubos PCR Strip Tubes & Caps (Axygen, CA, EE. UU.). La qPCR se realizó en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania) con las condiciones siguientes (Tabla 3):

**Tabla 3.** Condiciones de reacción para qPCR.

Fase		Condiciones
Desnaturalización inicial		95°C 1 min
Amplificación 40 ciclos	Desnaturalización	95 °C 5 s
	Alineamiento	62 °C 30 s
	Elongación	72 °C 40 s
"Melting" (fusión)		72 °C-95 °C

### III.3.3 Recta de calibrado y obtención de la concentración en las muestras

La recta de calibrado se obtuvo mediante la representación del logaritmo decimal de las concentraciones conocidas de ADN (ng/µl) a partir de diluciones de cultivo puro de *Pa. chlamydospora* frente al valor de Ct ("Cycle threshold"). Con este valor de cada muestra analizada se pudo estimar la concentración de ADN del patógeno empleando la

ecuación obtenida en la recta de calibrado. Finalmente, con un programa que mostraba las curvas de “melting” se identificaron los productos inespecíficos que pudiesen resultar en falsos positivos.

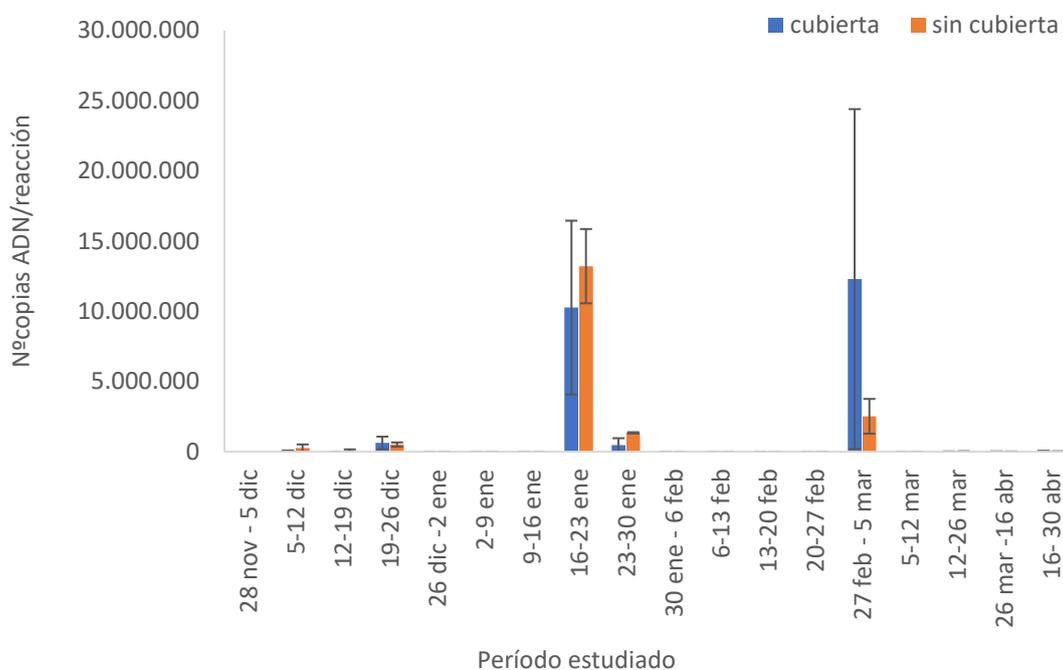
### **III.4 Análisis estadístico**

El efecto de la parcela y presencia de cubierta vegetal sobre la concentración de ADN del patógeno detectada se evaluó mediante un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis utilizando el programa Statgraphics XVII (Statgraphics Technologies, Inc. USA). Además, se estudió la posible correlación entre los datos observados y predicho por el modelo mediante un análisis de regresión.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 8 se representa la concentración de ADN de *Pa. chlamydospora* detectada en las muestras obtenidas a partir de capturadores instalados cerca de la fuente de inóculo en las parcelas con y sin cubierta vegetal durante el período de estudio comprendido entre el 28 de noviembre hasta el 30 de abril.

Se detectó el patógeno tanto en las parcelas con cubierta como en las de sin cubierta en 11 de las 18 semanas estudiadas, con valores variables entre 851 y 13.213.742 copias del fragmento específico de ADN del patógeno *Pa. chlamydospora* por reacción. Se observaron resultados similares para las parcelas con y sin cubierta vegetal. Los periodos en los que se detectó una mayor concentración de ADN tanto en las parcelas con cubierta como en las de sin cubierta, fueron del 16 al 30 de enero y la semana del 27 de febrero al 5 de marzo. Las concentraciones más bajas de ADN se detectaron en dos periodos, desde el 26 de diciembre al 10 de enero y desde el 30 de enero al 20 de febrero para las parcelas con y sin cubierta vegetal.



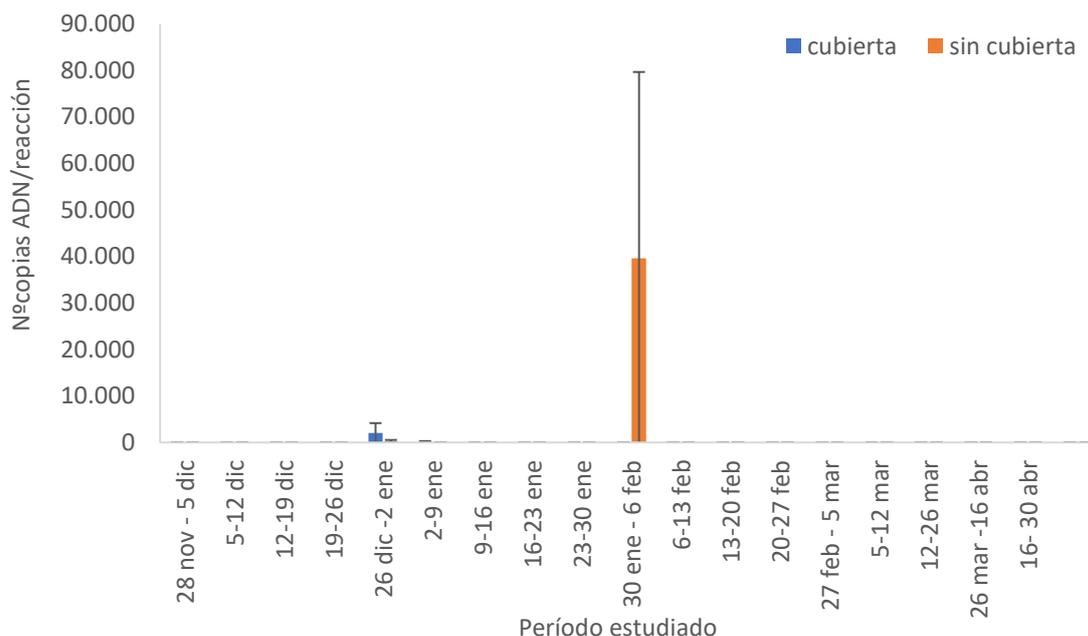
**Figura 8.** Concentración de ADN del patógeno detectada semanalmente en los capturadores instalados cerca de la fuente de inóculo a lo largo del período de estudio.

En la Figura 9 se representa la concentración de ADN de *Pa. chlamydospora* detectada en las muestras obtenidas a partir de los capturadores instalados cerca de las plantas de viña en las parcelas con y sin cubierta vegetal durante el período de estudio comprendido entre el 28 de noviembre hasta el 30 de abril.

Se detectó el patógeno tanto en las parcelas con cubierta y sin cubierta en 3 de las 18 semanas estudiadas, con valores variables entre 36 y 39.637 copias del fragmento específico de ADN del patógeno *Pa. chlamydospora* por reacción. Las concentraciones obtenidas fueron menores comparadas con las detectadas en los capturadores instalados cerca de la fuente de inóculo, pero en general, se observaron resultados similares para las parcelas con y sin cubierta vegetal. El periodo en el que se detectó una mayor concentración de ADN tanto en las parcelas con cubierta como en las de sin

cubierta fue del 26 de diciembre al 2 de enero. En las parcelas sin cubierta vegetal también se detectó una elevada concentración de ADN en la semana del 30 de enero al 6 de febrero.

El resultado del análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre parcelas independientemente de la presencia de cubierta vegetal, tanto para los datos obtenidos de los capturadores próximos a la fuente de inóculo como para los capturadores instalados cerca de las plantas ( $P=0,4407$  y  $P=0,98328$ , respectivamente). Por tanto, para las siguientes representaciones se calculó el promedio de los resultados obtenidos en todas las parcelas analizadas.



**Figura 9.** Concentración de ADN del patógeno detectada semanalmente en los capturadores instalados próximas a las plantas a lo largo del período de estudio.

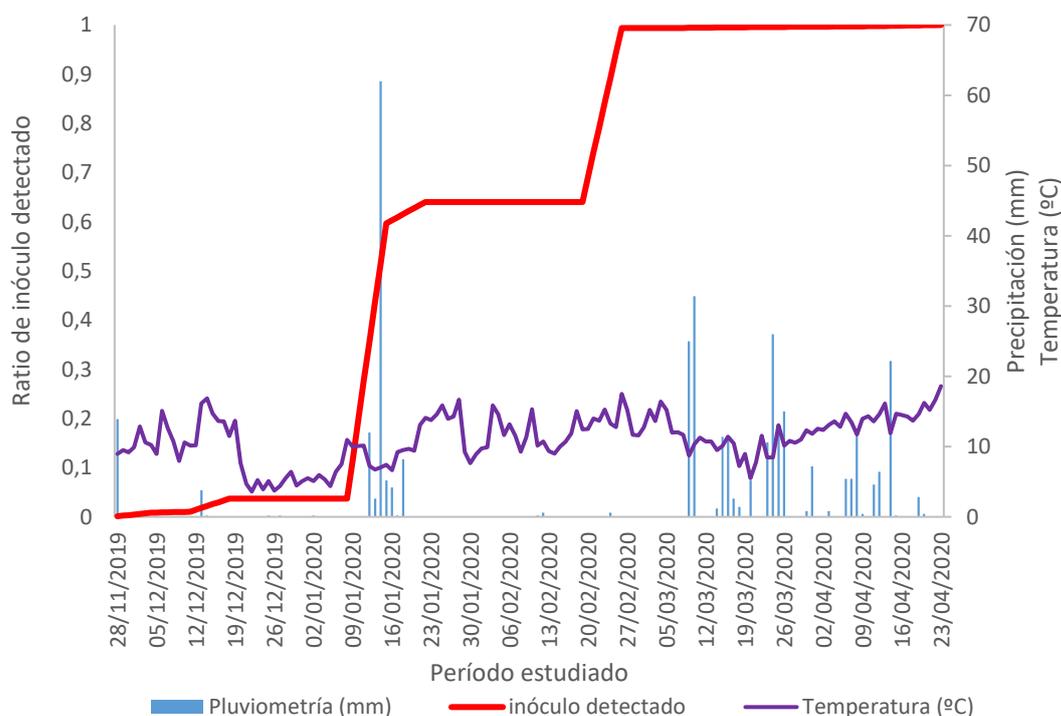
En este estudio se encontró ADN del patógeno en las vides con cubierta y sin cubierta sobre todo en las cercanas a la fuente de inóculo. Este hecho probablemente fue debido a que el cultivo de cobertura en la parcela había crecido de forma espontánea, sin homogeneidad en la superficie cubierta y de altura limitada debido a la escasez de lluvia, limitando así su efecto positivo sobre la disminución en la dispersión del patógeno. Por esta razón, parece indiferente la existencia o no de cubierta vegetal. Sin embargo, distintos estudios demuestran que los cultivos de cobertura pueden mejorar la capacidad de producción de estos, el estado sanitario del suelo y mantener la sostenibilidad de los agroecosistemas (Reed-Jones et al., 2016).

Según indican Penfold y Howie, 2019 en su estudio, se obtuvieron buenos resultados agronómicos con una variedad de especies de pastos anuales, incluidas *Medicago spp* y *Trifolium spp*. Estas leguminosas se auto-regeneran naturalmente, fijan nitrógeno y su ciclo de vida comprendido entre mediados de otoño a primavera coincide con la latencia del cultivo de la vid. Además, dependiendo del pH del suelo, estas especies se adaptan bien al entorno. Otros estudios como el realizado por Ntahimpera et al. (1998) sobre *Sorghum bicolor* var. sudanensis describen el efecto positivo que produce la cubierta vegetal sobre la dispersión de conidios del patógeno *Colletotrichum acutatum* donde se

demuestra una reducción significativa de la dispersión de este hongo en comparación con el cultivo a suelo desnudo.

También, Penfold y Howie, 2019 afirman que tras tres años de pruebas de cultivos de cobertura en viña se ha comprobado que pueden generar un rendimiento similar o superior y mejorar la calidad del suelo a menor coste. Se pueden emplear otras alternativas, como paja y abono orgánico, para minimizar el establecimiento de malas hierbas y mejorar la calidad del suelo, pero esto requiere una renovación regular y por tanto un mayor coste.

Respecto a la sanidad vegetal, se sabe que las cubiertas vegetales son capaces de paliar las enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo, debido al incremento de la actividad y diversidad de microorganismos en el suelo dado por la competencia por los nutrientes (Everts, 2016). Los hongos micorrízicos arbusculares ayudan a la protección de las plantas hospedantes frente a patógenos. Estos hongos pueden aumentar en el suelo agrícola en parcelas en las que están presentes especies de gramíneas como la, el centeno, y el trigo de invierno (Penfold y Howie, 2019).



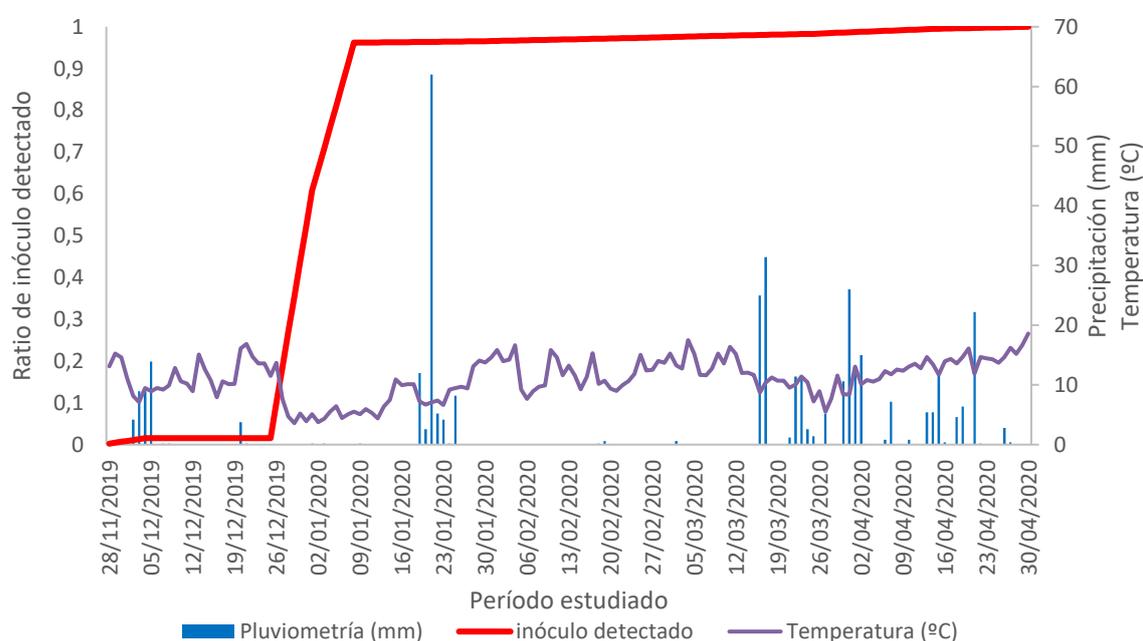
**Figura 10.** Ratio del inóculo detectado a lo largo del período de estudio en los capturadores próximos a la fuente de inóculo representado junto con los valores de las variables ambientales registradas.

La Figura 10 representa el ratio de inóculo detectado (concentración de ADN del patógeno acumulada relativa al máximo detectado durante el periodo de estudio) y los valores diarios de las principales variables ambientales registradas incluyendo temperatura media (°C) y pluviometría (mm). Inicialmente se observó un leve aumento del ratio a los 22 días tras un período de escasa precipitación (5 mm) y temperaturas de 15 °C aproximadamente. Luego este ratio se mantuvo de forma constante en los siguientes días.

El día 16 de enero, coincidiendo con elevadas precipitaciones registradas (65 mm) y temperaturas próximas a 10 °C, se observó el mayor incremento del ratio acumulado que luego se mantuvo constante durante un período de precipitaciones nulas y temperaturas oscilantes entre los 10 y 20 °C.

Finalmente, el día 27 de febrero en el día 99 se detectó el último incremento sin coincidir con precipitaciones y con 15 °C de temperatura media registrada, manteniéndose de forma constante en el resto de días, en los cuales las precipitaciones incrementaron y las temperaturas tendieron a aumentar alcanzando finalmente los 20 °C.

En las trampas alejadas de la fuente de inóculo (Figura 11) se observó el valor máximo del ratio en el día 12 de febrero con precipitaciones nulas y temperaturas próximas a 20 °C. En el resto de días, independientemente de las épocas de elevada pluviometría y temperaturas entre 10 y 20 °C, no se detectó presencia del ADN del patógeno.



**Figura 11.** Ratio del inóculo detectado a lo largo del período de estudio en los capturadores próximos a las plantas representado junto con los valores de las variables ambientales registradas.

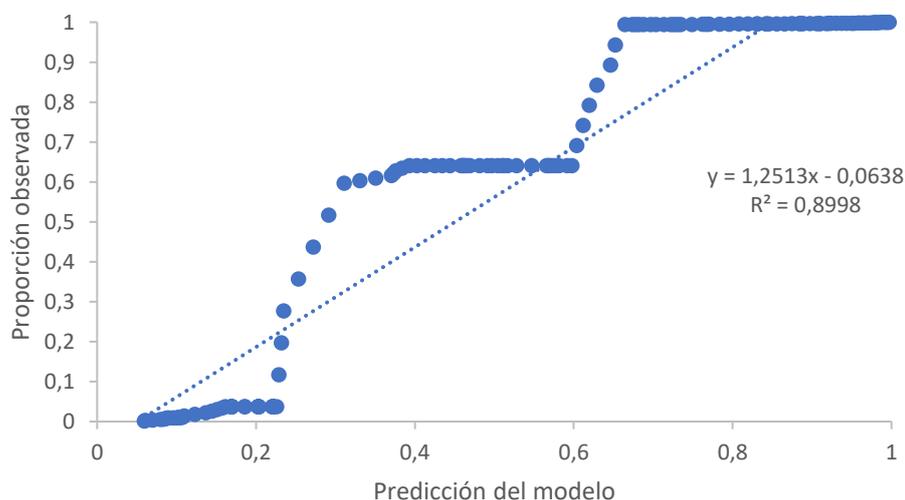
La concentración de ADN de *Pa. chlamydospora* detectada en los capturadores cercanos a las plantas, incrementó durante dos semanas consecutivas a lo largo de todo el período de estudio, mientras que los capturadores cercanos a la fuente de inóculo mostraron un aumento de la concentración de ADN durante tres semanas no consecutivas.

Tanto en los capturadores cercanos a la fuente de inóculo como en los cercanos a las plantas se observó un incremento en el ratio del inóculo tras un período de precipitaciones y temperaturas moderadas. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Eskalen y Gubler (2001) donde se demostró la relación existente entre las épocas de precipitación y la liberación de conidios de *Pa. chlamydospora*. De acuerdo con un estudio recientemente publicado sobre la dinámica temporal del inóculo de *Pa. chlamydospora*, el incremento en la disponibilidad de inóculo y detección está influenciado no solo por la precipitación sino también por la temperatura (González-Domínguez et al., 2020). Los resultados obtenidos en los capturadores instalados cerca

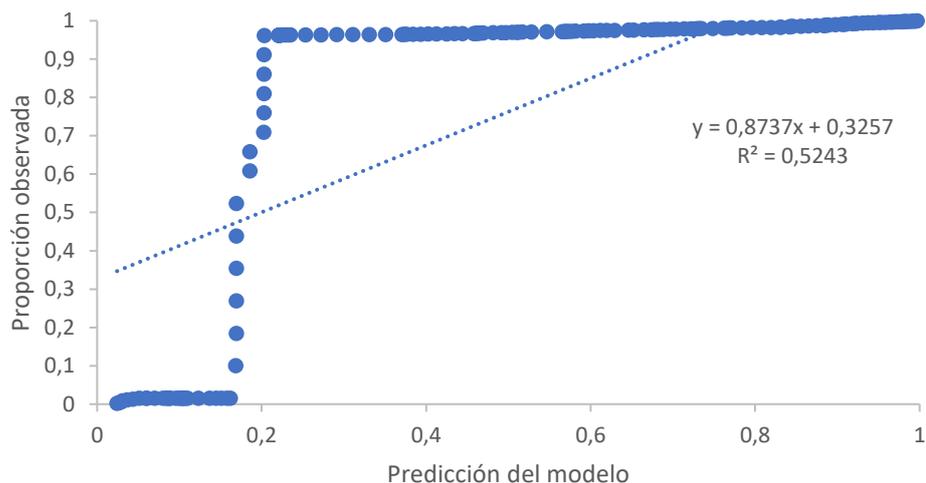
de las plantas parecen indicar que la dispersión del inóculo se asocia a la precipitación y temperaturas medias moderadas, ocurriendo de forma similar en aquellos capturadores recogidos cerca de la fuente de inóculo.

La temperatura es un factor limitante fundamental en el desarrollo de enfermedades, pues hay un umbral por debajo del cual muchos patógenos fúngicos no se desarrollan (Coscollá, 1980). Por otro lado, las precipitaciones parecen ser un factor fundamental para el desarrollo de enfermedades y la dispersión de esporas fúngicas. Según Sáez, 2011, la precipitación, en el caso de la Eutipiosis está relacionada con la liberación de ascosporas que podrían penetrar e infectar las plantas a través de las heridas de poda. A larga distancia estas ascosporas son dispersadas a través del viento. En el estudio de Eskalen et al., (2001) se demostró que el inóculo aéreo de *Pa. chlamydospora* se libera principalmente durante y después de períodos de lluvia. Además, se ha demostrado la relación existente entre la dispersión de otros hongos asociados a EFMV como *Botryosphaeriaceae* y *Phomopsis spp.* y pluviometría con valores mínimos de 0,25 mm en el área de Stellenbosch en Sudáfrica (van Niekerk et al., 2010).

La proporción observada del ADN de los capturadores instalados en las parcelas se comparó con la concentración de ADN predicho por un modelo de predicción de la disponibilidad del inóculo de *Pa. chlamydospora* en el aire en función de las condiciones ambientales descrito por González- Dominguez et al. (2020). Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre el ADN observado y predicho por el modelo. En el caso de los capturadores cercanos a la fuente de inóculo, los resultados del análisis mostraron una correlación positiva significativa entre ambos valores con un coeficiente de determinación elevado ( $R^2 = 0,8998$ ) (Figura 12). En el caso de los capturadores instalados próximos a las plantas, también se observó una correlación positiva significativa, aunque el coeficiente de determinación resultó inferior ( $R^2 = 0,5243$ ) (Figura 13). Estos resultados validan el modelo y la metodología utilizada en el trabajo.



**Figura 12.** Proporción observada del ADN de *Pa. chlamydospora* de los capturadores próximos a la fuente de inóculo sobre la predicción del modelo.



**Figura 13.** Proporción observada del ADN de *Pa. chlamydospora* de los capturadores próximos a las plantas sobre la predicción del modelo.

Este estudio muestra la variación de la dispersión de esporas a lo largo del período de muestreo en parcelas de vid en función de las variables climáticas (temperatura y pluviometría) demostrando si la implantación de cultivos de cobertura para el control de la dispersión de las esporas del patógeno *Pa. chlamydospora* es viable en parcelas con cultivo de vid en la zona mediterránea. Como indican las figuras anteriores y el análisis estadístico, no se han experimentado diferencias entre las muestras tomadas en las zonas con y sin cultivo de cobertura. Esto lleva a que el uso cultivo de cobertura espontánea en la zona mediterránea en plantaciones de vid y para esta enfermedad no sería una práctica recomendable puesto que no existen cambios positivos sobre el cultivo.

## V. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio mostraron que la concentración de ADN del patógeno encontrada en los capturadores cercanos a la fuente de inóculo en las parcelas con y sin cubierta fueron similares. La mayor cantidad de inóculo se detectó principalmente entre los meses de enero y marzo.

La concentración de ADN encontrada en los capturadores próximos a las plantas también fue similar entre las parcelas con y sin cubierta vegetal. El periodo en el que se detectó una mayor concentración de ADN tanto en las parcelas con cubierta como en las de sin cubierta fue entre los meses de diciembre y febrero.

El resultado del análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre parcelas independientemente de la presencia de cubierta vegetal, tanto para los datos obtenidos de los capturadores próximos a la fuente de inóculo como para los capturadores instalados cerca de las plantas.

En los capturadores cercanos a la fuente de inóculo y los cercanos a las plantas se observó un incremento en el ratio del inóculo tras un período de precipitaciones y temperaturas moderadas.

Respecto al modelo de predicción, los resultados del análisis mostraron una correlación positiva significativa tanto en los capturadores instalados próximo a las plantas como en los próximos a la fuente de inóculo, siendo el coeficiente de determinación más elevado en estos últimos.

Se encontró ADN del patógeno tanto en las vides con cubierta como las de sin cubierta sobre todo en las cercanas a la fuente de inóculo. Por esta razón, parece indiferente la existencia o no de cubierta vegetal. Esto lleva a pensar que el uso cultivo de cobertura espontánea en la zona mediterránea en plantaciones de vid y para esta enfermedad no sería una práctica recomendable puesto que no existen cambios positivos sobre el cultivo. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado el efecto positivo de la cubierta vegetal sobre el cultivo y por ello sería necesario continuar investigando para demostrar esta eficacia.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

AGUSTÍ-BRISACH, C.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2015) Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. *Plant Disease*, 99: 976-981.

ARIZMENDI, S. (2015) Desarrollo de un protocolo de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación del inóculo de *Phaeomoniella chlamydospora* en campo. <https://riunet.upv.es> (Consultado 3 de marzo de 2021).

BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOU-MANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. (2012) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62: 243-265.

COSCOLLÁ, R., 1980. Incidencia de los factores climatológicos en la evolución de las plagas y enfermedades de las plantas. *Plagas*, 6: 123-139. 1980. Silla (Valencia).

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

DE LA FUENTE, M., (2016) Grapevine trunk diseases. A review. Edita OIV (Organización Internacional de la viña y del Vino). <https://www.oiv.int/public/medias/4650/trunk-diseases-oiv-2016.pdf> (Consultado 3 de marzo de 2021).

ELENA, G. y LUQUE, J. (2016) Seasonal susceptibility of grapevine pruning wounds and cane colonization in Catalonia, Spain following artificial infection with *Diplodia seriata* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*, 100:1651-1659.

ESKALEN, A y GUBLER, W., 2001. Association of spores of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathol. Mediterr.* (2001) 40, Supplement, S429–S432. Department of Plant Pathology, University of California, One Shields Ave., Davis, CA 95616, USA.

EVERTS, K., 2016. Soil biology: cover crops and disease suppression. Sustainable agriculture research & education. <https://www.southernsare.org/SARE-in-Your-State/North-Carolina/State-News/Cover-Crops-Research-Across-the-Southern-Region/Soil-Biology-Cover-Crops-and-Disease-Suppression/> (Accessed on 15<sup>th</sup> July 2019) (Consultado 20 de marzo de 2021).

FAO-OIV. 2016. Table and dried grapes (FAO-OIV focus 2016). Food and agriculture organization of the United Nations and the International Organisation of vine and wine. <http://www.fao.org/documents/card/es/c/709ef071-6082-4434-91bf-4bc5b01380c6/>. (Consultado 3 de abril de 2021).

FINNEY, D.M., BUYER, J.S. y KAYE, J.P. Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *Journal of soil and water conservation*. July/August 2017—Vol. 72, NO. 4.

GARCÍA, R y MUDARRA, I., 2008. Buenas prácticas en producción ecológica cultivo de la Vid. [http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/bppe/Cultivo\\_de\\_la\\_Vid\\_tcm7-187417.pdf](http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/bppe/Cultivo_de_la_Vid_tcm7-187417.pdf) (Consultado 3 de abril de 2021).

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; BERLANAS, C.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; ROSSI, V.; BERBEGAL, M., 2020. Temporal dispersal pattern of *Phaeomoniella chlamydospora*, causal agent of esca disease in Spanish vineyard. *Phytopathology*, vol. 110, No. 6, 2020.

GRAMAJE, D. y ARMENGOL, J. (2011) Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 9: 1041-1055.

GRAMAJE, D. y DI MARCO, S. (2015) Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54: 313-324.

GRAMAJE, D. y LARIGNON, P. (2015) Epidemiology of GTDs: unraveling the main pathogen life cycle 1. *manaGTD Sustainable control of grapevine trunk diseases*. Budapest, Hungary: WG1 (Pathogen characterization, detection and epidemiology) and WG2 (Microbial ecology) meeting.

GRAMAJE, D.; MOSTERT, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. (2015) *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, 119: 759-783.

GRAMAJE, D.; URBEZ-TORRES, JR.; SOSNOWSKI, MR. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102 : 12-39.

IVIA., 2017. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Butlletí D' avisos número 16. Generalitat Valenciana.  
<http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/164081735/boletin+16corregidoV2-1.pdf/6c208eab-d3f2-425e-aef4-123ebc9038b5> (Consultado 10 de abril de 2021).

KUBÁTOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; PAŽOUTOVÁ, S. (2004) *Phaeoacremonium rubrigenum* - Hyphomycete associated with bark beetles found in Czechia. *Folia Microbiologica*, 49: 99-104.

LUQUE, J.; ELENA, G.; ARMENGOL, J.; LEGORBURU, J. (2014) Las enfermedades de la madera de la vid: reflexiones sobre un panorama complejo. *Phytoma España*, 260: 18-24.

MAGRAMA (2014). Guía de gestión integrada de plagas "Uva de transformación". Edita Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.  
[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAUADETRANSFORMACION\\_tcm30-57934.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAUADETRANSFORMACION_tcm30-57934.pdf) (Consultado 16 de abril de 2021).

MAPAMA, 2020. La producción de vino y mosto de la campaña 2019/2020 se sitúa en 37,2 millones de hectolitros.  
[https://www.mapa.gob.es/es/prensa/200114datosinfolvi\\_tcm30-523945.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/prensa/200114datosinfolvi_tcm30-523945.pdf) (Consultado 16 de abril de 2021).

NTAHIMPERA, N.; ELLIS, M.A.; WILSON, L.L.; MADDEN, L.V., 1998. Effects of a cover crop on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* conidia. *Phytopathology*, 88: 536-543.

OIV, 2020. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2019.  
<https://www.oiv.int/public/medias/7304/es-actualidad-de-la-coyuntura-del-sector-vitivinicola-mundia.pdf> (Consultado 17 de abril de 2021).

OIV., 2019. La OIV actualiza las estadísticas vitivinícolas mundiales. [http://www.sevi.net/es/3547\\_Estadisticas/12/13583/La-OIV-actualiza-las-estad%C3%ADsticas-vitivin%C3%ADcolas-mundiales.htm](http://www.sevi.net/es/3547_Estadisticas/12/13583/La-OIV-actualiza-las-estad%C3%ADsticas-vitivin%C3%ADcolas-mundiales.htm) (Consultado 17 de abril de 2021).

PENFOLD, C y HOWIE, J., 2019. Under-vine cover cropping. Wine Australia for Australian wine. [https://www.wineaustralia.com/getmedia/384c2ac3-b0b1-4c7b-9c7c-a8904090a69b/CORD\\_Factsheets\\_CoverCropsUndervine\\_V2.pdf](https://www.wineaustralia.com/getmedia/384c2ac3-b0b1-4c7b-9c7c-a8904090a69b/CORD_Factsheets_CoverCropsUndervine_V2.pdf) (Consultado 23 de abril de 2021).

RAMÍREZ, P y LASHERAS, J., 2015. Guía de cubiertas vegetales en vid. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. <https://www.juntadeandalucia.es> (Consultado 25 de abril de 2021).

REED-JONES, N.; MARINE, S.C.; EVERTS, K.; MICALLEF, S., 2016. Effect of cover species and season on population dynamics of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 1767-1777.

RICHARDS, A., MEHRBOD, M., ÚRBEZ, JR., BOWEN, P., LOWERY, T y HART, M., 2020. Cover crop diversity as a tool to mitigate vine. Decline and reduce pathogens in vineyard soils. *Diversity* 2020, 12, 128; doi:10.3390/d12040128.

ROMERO, C y CADENAS, C., 2013. Identificación y caracterización del agente causal de la "enfermedad de petri" de la vid (*Vitis vinifera* L.) en el Perú. *Anales Científicos*, 75 (1): 138 - 145 (2014). <file:///C:/Users/Ana%20Belen/Downloads/Dialnet-IdentificacionYCaracterizacionDelAgenteCausalDeLaE-7003405.pdf> (Consultado 30 de abril de 2021).

SÁEZ, P.B., 2011. Enfermedades de madera de la vid. <http://urbinavinos.blogspot.com/2011/06/enfermedades-de-madera-de-la-vid.html> (Consultado 5 de mayo de 2021).

VAN NIEKERK, J.M; CALITZ, F.; HALLEEN, F.; FOURIE, P., 2010. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 375-390.