

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**DEPARTAMENT D'ECOSISTEMES AGROFORESTALS**

**MÀSTER UNIVERSITARI EN SANITAT I PRODUCCIÓ VEGETAL**

**Estudio de la producción del teleomorfo de  
*Phaeoacremonium minimum* y del sinanamorfo de  
*Phaeomoniella chlamydospora* a diferentes  
temperaturas**

ALUMNO: D. VICENT MORANT REIG

TUTOR: Dr. JOSEP ARMENGOL FORTÍ

COTUTOR: Dra. MÓNICA BERBEGAL MARTÍNEZ

*Curso Académico: 2018/2019*

VALÈNCIA, julio de 2019

Tipo Licencia



## TÍTULO

**Estudio de la producción del teleomorfo de *Phaeoacremonium minimum* y del sinanamorfo de *Phaeomoniella chlamydospora* a diferentes temperaturas**

## RESUMEN

*Phaeoacremonium minimum* y *Phaeomoniella chlamydospora* son dos de los principales hongos de la madera de la vid asociados a la Yesca y la enfermedad de Petri en este cultivo. La información sobre la biología de estos hongos patógenos es todavía escasa. Por ejemplo, no se conocen las condiciones de temperatura que determinan la formación de la fase sexual (teleomorfo) de *Pm. minimum* y del sinanamorfo de *Pa. chlamydospora*. En este estudio se evaluó la formación de ambas estructuras reproductivas a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C durante un mes y medio de incubación bajo luz continua. A las temperaturas de 15, 20 y 25°C, tanto para *Pa. chlamydospora* y *Pm. minimum*, se obtuvo una producción significativamente mayor de estructuras reproductivas fértiles (peritecios y picnidios, respectivamente). Para ambos hongos los cuerpos fructíferos se desarrollaron después de 21 días de incubación a luz continua para 15 y 20°C, y después de 28 días a 25°C. A las temperaturas de 5, 10 y 30°C, la presencia de picnidios y peritecios fue muy escasa y no se observó que produjeran conidios o ascosporas, respectivamente.

**Palabras clave:** Enfermedades fúngicas de la madera; Enfermedad de Petri; *Vitis vinifera*; Yesca

**Autor del TFM:** D. Vicent Morant Reig

**Tutor académico:** Dr. Josep Armengol Fortí

**Cotutor:** Dra Mónica Berbegal Martínez

**València, Julio de 2019**

## TITLE

Production of the sexual morph of *Phaeoacremonium minimum* and the synanamorph of *Phaeomoniella chlamydospora* at different temperatures

## ABSTRACT

*Phaeoacremonium minimum* and *Phaeomoniella chlamydospora* are two of the main fungal grapevine trunk pathogens associated with Esca and Petri diseases in this crop. Information on the biology of these pathogenic fungi is still scarce. For example, the temperature conditions that determine the formation of the sexual morph (teleomorph) of *Pm. minimum* and of the synanamorph of *Pa. chlamydospora* are not well known. In this study the formation of both reproductive structures was evaluated at temperatures of 5, 10, 15, 20, 25 and 30 °C during a month and a half of incubation under conditions of continuous light. At the temperatures of 15, 20 and 25°C, both *Pa. chlamydospora* and *Pm. minimum*, had a significantly greater production of fertile reproductive structures (perithecia and pycnidia, respectively). For both fungi, fruiting bodies developed after 21 days of continuous light incubation for 15 and 20°C, and after 28 days at 25°C. At the temperatures of 5, 10 and 30 °C, the presence of pycnidia and perithecia was very scarce and it was not observed that they produced conidia or ascospores, respectively.

**Keywords:** Esca; Fungal trunk pathogens; Petri disease; *Vitis vinifera*

## **Agradecimientos**

Agradecer a los tutores de este trabajo final de máster, el Dr. Josep Armengol Fortí y la Dra. Mónica Berbegal Martínez, por abrirme las puertas del Laboratorio de Patología Vegetal con el trabajo final del Grado, para continuar con el trabajo final del Máster de Agrónomos y por último terminar mi formación universitaria con este trabajo final del Máster de Sanidad y Producción vegetal.

# Índice

<b>I.Introducción</b> .....	1
I.1 Importancia del cultivo de la vid en España.....	1
I.1.1 Superficie.....	1
I.1.2 Producción.....	1
I.2. Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid.....	1
I.2.1. Concepto y síntomas de las enfermedades.....	2
Enfermedad de Petri.....	3
Yesca.....	4
I.2.2 Fuentes de inóculo y vías de dispersión de las EFMV.....	4
I.2.2.1. Fuentes de inóculo.....	4
I.2.2.2 Dispersión.....	5
I.3 Descripción de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y <i>Phaeoacremonium minimum</i> .....	5
I.3.1 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	5
I.3.2 <i>Phaeoacremonium minimum</i> .....	8
<b>II.Objetivos</b> .....	10
<b>III.Materiales y métodos</b> .....	11
III.1 Aislados fúngicos utilizados.....	11
III.2 Preparación de las suspensiones de esporas.....	11
III.3 Inoculación de fragmentos de madera y condiciones de incubación.....	12
III.4 Evaluación.....	13
III.5 Análisis estadístico de los datos.....	14
<b>IV.Resultados y Discusión</b> .....	15
<b>V.Conclusiones</b> .....	35
<b>VI.Bibliografía</b> .....	36

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resumen nacional de la superficie de vid en España el año 2017(hectáreas) (de: MAPA, 2019).....	1
<b>Tabla 2.</b> Detalles de los aislados utilizados en este estudio.....	11
<b>Tabla 3.</b> Valor asignado según el porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del sinanamorfo de <i>Pa. chlamydospora</i> o peritecios de <i>Pm. minimum</i> .....	13
<b>Tabla 4.</b> Presencia de peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).....	15
<b>Tabla 5.</b> Presencia de peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).....	16
<b>Tabla 6.</b> Presencia de picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).....	16
<b>Tabla 7.</b> Presencia de picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación(14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).....	17
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación .....	20
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación .....	20
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación .....	20
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación .....	21
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación .....	21

<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C., tras 42 días de incubación .....	21
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación .....	22
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación .....	22
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación .....	22
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C., tras 42 días de incubación .....	23
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación .....	23
<b>Tabla 19.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación .....	23
<b>Tabla 20.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación .....	24
<b>Tabla 21.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C., tras 42 días de incubación .....	24
<b>Tabla 22.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación .....	24
<b>Tabla 23.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación .....	25
<b>Tabla 24.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación .....	25

<b>Tabla 25.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C., tras 42 días de incubación .....	25
<b>Tabla 26.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación .....	26
<b>Tabla 27.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación .....	26
<b>Tabla 28.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación .....	26
<b>Tabla 29.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C., tras 42 días de incubación .....	27
<b>Tabla 30.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación .....	27
<b>Tabla 31.</b> Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación .....	27



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Evolución de la producción de vino y mosto en España (x 1.000 hl) de la campaña 2008/2009 a la campaña 2012/2013 (de: MAPAMA, 2019).....	2
<b>Figura 2</b> Sintomatología de las EFMV. 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). .....	3
<b>Figura 3.</b> a) Conidióforos y conidios de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ; b) Conidióforos y conidios del sinanamorfo tipo <i>Phoma</i> (De: Crous y Gams, 2000).....	6
<b>Figura 4.</b> Ciclo patológico de la enfermedad de Petri y de la Yesca causado por <i>Pm. minimum</i> y <i>Pa. chlamydospora</i> , adaptado de (Gramaje <i>et al.</i> , 2015; Gramaje y Larignon, 2015).....	7
<b>Figura 5.</b> <i>Togninia minima</i> y su anamorfo <i>Phaeoacremonium minimum</i> . 1. Peritecio; 2. Ascas con disposición espigada en hifas ascogénicas; 3. Parafisos; 4. Ascosporas; 5. Ascas; 6. Conidióforos y células conidiogénicas; 7. Conidias (Mostert <i>et al.</i> , 2003).....	9
<b>Figura 6.</b> Cultivos en PDAS de a) aislado 91 de <i>Phaeoacremonium minimum</i> , b) aislado 95 de <i>Pm. minimum</i> y c) aislado 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	12
<b>Figura 7.</b> Placas Petri con fragmentos de madera e inoculadas con los hongos del estudio, depositadas en un incubador bajo luz blanca continua.....	13
<b>Figura 8.</b> Promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de <i>Phaeoacremonium minimum</i> 36/38 y 91/95 (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C Las barras representan el error estándar de los promedios.....	28
<b>Figura 9.</b> Promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 y 211 de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C Las barras representan el error estándar de los promedios.....	29
<b>Figura 10</b> Promedios de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de <i>Phaeoacremonium minimum</i> (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las letras iguales representan que los valores no son estadísticamente diferentes según el test LSD (P<0.05). Las barras representan el error estándar de los promedios.....	29

**Figura 11.** Promedios de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las letras iguales representan que los valores no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar de los promedios.....30

**Figura 12.** a) b) Picnidios de *Phaeomoniella chlamydospora* exudando una masa de conidios. c) d) f) Peritecios de *Phaeoacremonium minimum* formados en la superficie de los fragmentos de madera, algunos de ellos exudando ascoporas. e) Ascas de *Phaeoacremonium minimum* con ascoporas en su interior. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .....32

# **I.INTRODUCCIÓN**

# I.Introducción

## I.1 Importancia del cultivo de la vid en España

### I.1.1 Superficie

La vid en España cuenta con una superficie de 939.283 ha (MAPA, 2019), siendo uno de los principales cultivos por extensión (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen nacional de la superficie de vid en España el año 2017(hectáreas) (de: MAPA, 2019).

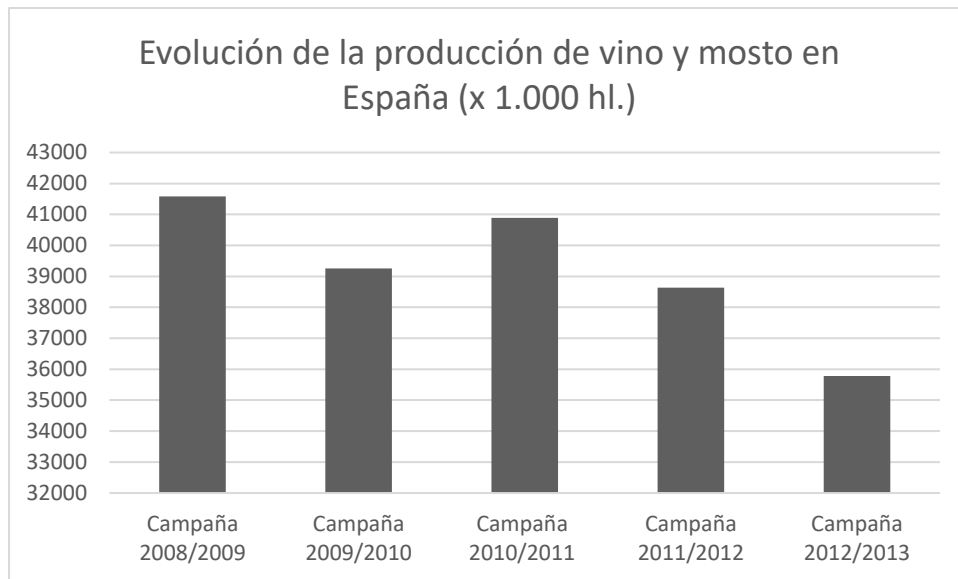
Cultivo	Superficie en plantación regular					Arranques en el año	Plantaciones nuevas en el año
	Total			En producción			
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío		
<b>VIÑEDO DE UVA DE MESA</b>							
En cultivo único	1.355	13.016	14.371	1.199	12.360	401	183
En cultivo asociado	35	10	45	35	9	–	–
<b>TOTAL</b>	<b>1.390</b>	<b>13.026</b>	<b>14.416</b>	<b>1.234</b>	<b>12.369</b>	<b>401</b>	<b>183</b>
<b>VIÑEDO DE UVA PARA VINIFICACIÓN</b>							
En cultivo único	667.848	243.152	911.000	624.808	213.474	15.979	15.915
En cultivo asociado	10.520	122	10.642	9.989	105	634	106
<b>TOTAL</b>	<b>678.368</b>	<b>243.274</b>	<b>921.642</b>	<b>634.797</b>	<b>213.579</b>	<b>16.613</b>	<b>16.021</b>
<b>VIÑEDO DE UVA PARA PASIFICACIÓN</b>	1.699	–	1.699	1.696	–	–	–
<b>VIVEROS DE VIÑEDO</b>	134	1.392	1.526	–	–	–	–
<b>TOTAL VIÑEDO</b>	<b>681.591</b>	<b>257.692</b>	<b>939.283</b>	<b>637.727</b>	<b>225.948</b>	<b>17.014</b>	<b>16.204</b>

### I.1.2 Producción

El valor de la producción del sector del vino y del mosto, según la 2ª estimación de la Renta Agraria de 2013, ha crecido un 26% respecto al año anterior, ascendiendo a 2.142,8 millones de euros (estimación en valores corrientes a precios básicos), aportando el 8,02% de la Producción Vegetal y casi el 4,8% de la Producción de la Rama Agraria en España (MAPA, 2019). El cultivo de la viña genera en mano de obra unos 18 millones de jornales aproximadamente (MAPA, 2019).

El vino es un producto con una balanza comercial positiva. Durante 2013, según datos provisionales de Aduanas, la balanza comercial para el vino y mosto tuvo un saldo positivo de 2.600 millones de euros (MAPA, 2019).

La producción de vino y mosto en España se caracteriza por su gran variabilidad de unas campañas a otras, debido a la fuerte dependencia del cultivo de las condiciones climatológicas (Figura 1). Siendo la media de las cinco últimas campañas (2008/2009 a 2012/2013) de 38,6 millones de hl (MAPA, 2019).



**Figura 1.** Evolución de la producción de vino y mosto en España (x 1.000 hl) de la campaña 2008/2009 a la campaña 2012/2013 (de: MAPAMA, 2019).

## I.2. Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid

### I.2.1. Concepto y síntomas de las enfermedades

En la actualidad, las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) se consideran uno de los principales retos para la sostenibilidad de la viticultura en todo el mundo. Estas enfermedades causan en el viñedo daños severos todos los años y su incidencia está creciendo rápidamente en todos los países productores vitícolas (De la Fuente, 2016).

Las EFMV son un grupo de enfermedades de la vid causadas por varios hongos patógenos que viven y colonizan la madera de los órganos perennes causando necrosis y decoloración de la madera, infecciones vasculares, y descomposición esponjosa. Las viñas afectadas muestran, externamente, un decaimiento general y progresivo (retraso en la brotación, yemas muertas, decaimiento de la planta, parada del desarrollo, clorosis, apoplejía, etc.) generalmente asociada con unos síntomas foliares acordes a las diferentes enfermedades, que inicialmente pueden causar pérdida de productividad y eventualmente la muerte de la viña (Mondello *et al.*, 2018).

Podemos agrupar las enfermedades de la madera en enfermedades que afectan a las plantas jóvenes pocos años después de la plantación (enfermedad de Petri y pie negro) y enfermedades de plantas adultas, que suelen aparecer más tarde en el viñedo ya establecido (yesca, eutipiosis y decaimiento por *Botryosphaeria*) (Figura 2). Estas enfermedades causan importantes pérdidas de producción y suponen costes económicos adicionales debido a la necesidad de replantación de las plantas muy afectadas o muertas (Armengol, 2017). El incremento global en incidencia de las EFMV, con la dificultad de un manejo efectivo, ha situado las EFMV como la principal prioridad de investigación para la industria vitivinícola y de uva de mesa mundial. Aunque la reducción en la disponibilidad de materias químicas eficientes para el control de las EFMV desde el 2000, ha jugado un papel importante en el impacto que estas enfermedades han tenido en la sanidad vegetal de las viñas, éste es también consecuencia de cambios experimentados en la viticultura en los pasados 30 años. El incremento en la densidad

de plantas en los viñedos, el aumento en el uso del doble cordón, la realización de podas más cortas, y la mecanización de prácticas del viñedo, en especial la poda, han favorecido el incremento de infecciones de patógenos asociados a las EFMV en viñas. Además, el aumento en costes de producción, en particular la mano de obra reduce la capacidad de los agricultores para incrementar los insumos, como la protección de heridas de poda (Gramaje *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Sintomatología de las EFMV. 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).

Concretamente, este trabajo se va a centrar en el estudio de las especies fúngicas *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum*, ambas asociadas a las enfermedades de Petri en vid joven y Yesca en vid adulta. Por ello, estas enfermedades se describen de forma detallada a continuación.

#### Enfermedad de Petri

Causada por las especies *Pa. chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*, y por hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium*. Estos hongos se encuentran en la parte basal del patrón, en los vasos colonizando los tejidos del xilema, siendo visibles unas pequeñas

punteaduras o estrías necróticas, al realizar un corte transversal o longitudinal de la planta. Los daños que provoca en la planta incluyen retraso en el desarrollo y escasa vitalidad, brotes con entrenudos cortos, hojas de menor tamaño y cloróticas, y en algunos casos la muerte de las plantas (MAGRAMA, 2014).

Yesca

Está causada principalmente por los hongos *Pa. chlamydospora* y *Pm. minimum*, que causan necrosis en la madera, y por varias especies de basidiomicetos, entre los que el más común es *Fomitiporia mediterranea* que provoca en la madera una podredumbre seca y esponjosa. Además de *Pm. minimum*, otras varias especies de *Phaeoacremonium* pueden estar involucradas en la etiología del complejo de la yesca. También los hongos *Eutypa lata* y *Stereum hirsutum* pueden desempeñar una función en la enfermedad del complejo de la yesca (Bertsch *et al.*, 2012).

Según su sintomatología, la yesca se puede presentar bajo dos formas: lenta y rápida o apopléjica. Si se presenta de forma lenta, las hojas muestran en las zonas internerviales 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).

## **I.2.2 Fuentes de inóculo y vías de dispersión de las EFMV**

Se ha demostrado la presencia de los patógenos causantes de las EFMV en las plantas madre de vid, así como en las plantas en producción de los viveros de vid, tanto injertos como barbados. Esto supone que podemos encontrar estos patógenos en las plantaciones nuevas (Gramaje y Armengol, 2011). Además, los hongos causantes de las EFMV se han encontrado tanto en la época de crecimiento del cultivo (primavera-verano) como en la de latencia (otoño-invierno), encontrándose principalmente en las cepas muertas, así como en los restos de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2015).

### **I.2.2.1 Fuentes de inóculo**

**Suelo.** Se ha sugerido que *Pa. chlamydospora* es un patógeno vinculado al suelo por su capacidad de producir clamidosporas en cultivo. Se piensa que a partir de las clamidosporas se podrían formar los conidios que posteriormente penetrarían en las raíces de viñas en viveros o viñedos. Este hongo, como *Pm. minimum* y otras especies del género *Phaeoacremonium* asociadas a las EFMV, se ha detectado que está presente en el suelo mediante técnicas moleculares. Las clamidosporas también pueden permitir la supervivencia de especies de *Ilyonectria spp.*, *Dactylonectria spp.* y otros hongos asociados al pie negro por períodos largos en el suelo (Gramaje y Armengol, 2011).

**Campos de plantas madre.** En muchos casos, 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 madre de vid no está relacionado con los síntomas externos observados. La presencia confirmada de estos patógenos en plantas asintomáticas con madera necrótica interna podría explicar que el hongo pueda permanecer de forma latente hasta que las viñas sufran estrés, como déficit hídrico o el ataque de nematodos, después de los cuales, la planta muestra síntomas de la enfermedad. Así, esto demostraría el alto potencial de riesgo de las

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

**Restos de poda.** Son la principal fuente de inóculo de la mayoría de patógenos relacionados con las EFMV, porque los restos de poda suelen albergar los cuerpos fructíferos de hongos como *Diplodia seriata*, *Cryptovalsa ampelina*, etc. Además, los agricultores a menudo retiran las cepas o brazos muertos, que dejan después en los márgenes del viñedo. Sobre estos restos vegetales la esporulación de los patógenos, como *E. lata*, se mantiene durante años, lo que contribuye a aumentar el riesgo de infección después de la poda. Por tanto, hay que eliminar los restos de poda, así como las partes enfermas (cepas y brazos muertos), y no dejarlas descomponerse en el campo (Luque *et al.*, 2014).

### **I.2.2.2 Dispersión**

Existen diferentes vías de dispersión de los hongos asociados a las EFMV:

**Viento.** Es considerada como la principal vía de dispersión de los patógenos que causan las EFMV en plantas adultas, ya que sus esporas pueden ser transportadas por el viento grandes distancias hasta infectar plantas susceptibles (Elena y Luque, 2016).

**Lluvia.** La dispersión de hongos asociados a la Yesca, eutipiosis y brazo negro muerto es debido en parte a las esporas que se transportan por las salpicaduras que produce la lluvia o el riego por aspersión (MAGRAMA, 2014). Baskarathevan *et al.* (2013) demostraron que las gotas de lluvia podían dispersar por salpicadura conidios de *Neofusicoccum parvum* y *N. luteum* hasta más de 2 metros desde el punto de inóculo en un solo episodio de lluvia.

**Herramientas de poda.** Uno de los factores de riesgo severo que afecta en la producción de planta de vivero es la contaminación de las herramientas de poda debido a la falta de desinfección regular por parte del personal que realiza esta labor de cultivo (Gramaje y Di Marco, 2015). Esto también se puede dar en los viñedos.

**Artrópodos.** Se han encontrado especies de *Phaeoacremonium* en larvas de coleópteros, lo que da a entender que éstos pueden ser vectores de los hongos que causan las EFMV, así como existen artrópodos presentes en viñedos con síntomas de decaimiento que son portadores de *Pa. chlamydospora* (Kubátová *et al.*, 2004; Moyo *et al.*, 2014).

## **I.3 Descripción de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum***

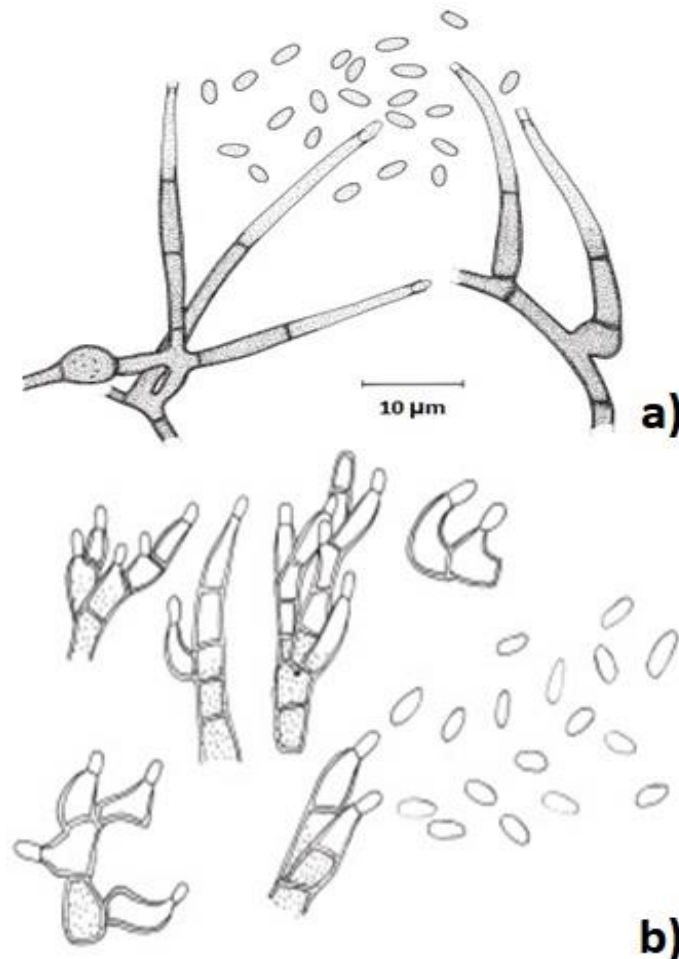
### **I.3.1 *Phaeomoniella chlamydospora***

El micelio de este hongo consiste en hifas tabicadas y ramificadas que pueden aparecer individualmente o en cordones de hasta diez. Las hifas son tuberculosas a verruculosas, con paredes de color marrón verdoso y tabiques más oscuros, que empiezan a ser más claros hacia la región conidiogénica, y de 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho. Las estructuras tipo clamidosporas son abundantes en la cepa tipo, pero escasas en otras cepas; globosas a subglobosas, sobre todo individuales, raramente en cadenas de hasta 5, de color oliváceo y lisas a marrón verdoso, y tuberculadas, de 7-15  $\mu\text{m}$  de largo y 5-17  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidióforos (Figura 3), son procedentes de hifas aéreas o sumergidas, erectos, simples, cilíndricos con elongación ampuliforme, de color marrón verdoso, con paredes gruesas en la base, empezando con paredes más delgadas y marrón verdoso más suaves hacia el ápice, 1-3 septos y 12-70  $\mu\text{m}$  de longitud y



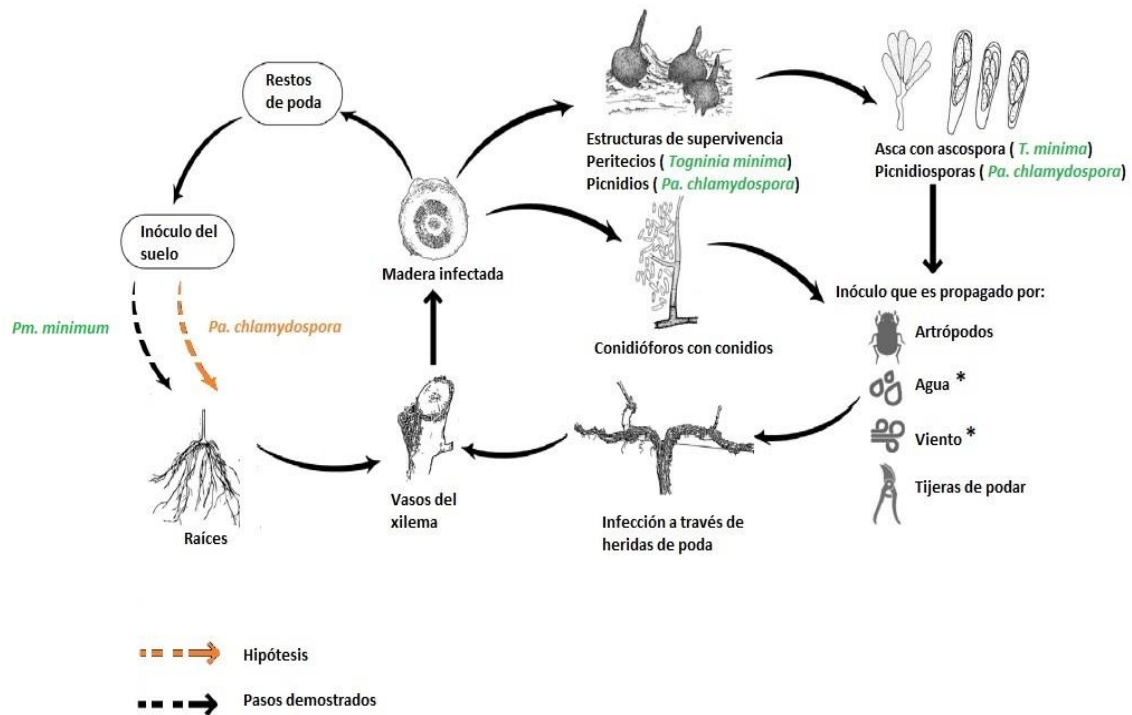
1,5-4,0  $\mu\text{m}$  de anchura. Las células conidiogénicas son solitarias, terminales, monofialídicas, de color verde claro o subhialinas, suaves (sin rugosidades), con elongación ampuliforme a lageniforme o subcilíndricas, de 2-20  $\mu\text{m}$  de largo, de 1,5-4.0  $\mu\text{m}$  de ancho en la parte hinchada, de 1,0-1,5  $\mu\text{m}$  de ancho en el ápice, con un collar terminal que va estrechándose en forma de embudo, de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de largo y de ancho. Los conidios se originan de forma agregada en fascículos, con cabezas viscosas en los ápices de las células conidiogénicas, subhialinos, oblongo-elipsoidales a obovados, permanentemente rectos, de dimensiones (1.5-) 3.0-4.0 (-4.5) x 1.0-1.5 (-2.0)  $\mu\text{m}$ .

Es muy importante destacar que esta especie presenta un sinanamorfo tipo *Phoma*: con picnidios de color castaño oscuro, globosos, de hasta 70  $\mu\text{m}$  de diámetro que en su interior tienen conidióforos de color castaño claro, subcilíndricos, lisos, 1-multiseptados, de 5-18 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Las células conidiogénicas son monofialídicas, terminales e intercaladas, variables en forma, pero frecuentemente subcilíndricas a oblongas-elipsoidales, de 3-9 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Los conidios se exudan desde los picnidios en cirros, son hialinos, oblongo-elipsoidales a obovados, permanentemente rectos, y de dimensiones (1.5-) 2.0-2.5 x 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  (Crous y Gams, 2000).



**Figura 3.** a) Conidióforos y conidios de *Phaeomoniella chlamydospora*. b) Conidióforos y conidios del sinanamorfo tipo *Phoma* (De: Crous y Gams, 2000).

El hongo *Pa. chlamydospora* vive en el xilema de la planta como endófito, donde produce libremente conidios que son transportados a través de la savia. El hongo tiene la habilidad de moverse, germinar, y penetrar a través de las paredes celulares del parénquima vascular, causando la necrosis de los tejidos. *Phaeomoniella chlamydospora* pasa el invierno en tejidos vasculares viejos de los restos de poda y en grietas profundas en brazos, troncos y pulgares. Además, puede sobrevivir en el suelo, pudiendo infectar las plantas a través de las raíces (Gramaje *et al.*, 2015) (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo patológico de la enfermedad de Petri y de la Yesca causado por *Pm. minimum* y *Pa. chlamydospora*, adaptado de (Gramaje *et al.*, 2015; Gramaje y Larignon, 2015).

En primavera, cuando la temperatura del aire y del suelo aumenta y las viñas empiezan a crecer vigorosamente, los patógenos se reactivan. *Phaeomoniella chlamydospora* produce conidios que serán dispersados por el agua, el viento, insectos y herramientas de poda (Gramaje *et al.*, 2015) (Figura 4).

Dado que las infecciones se realizan en su mayoría tras la poda a través de las heridas producidas en la planta, se ha especulado sobre la influencia del momento de poda en la susceptibilidad de la planta (Agustí-Brisach *et al.*, 2015). En estudios recientes, se ha demostrado que el mayor porcentaje de infección de los sarmientos se produce en los meses posteriores a la poda de invierno, siendo significativamente menor el porcentaje de infecciones si la poda se realiza en noviembre. Además, existe una correlación en los tres meses posteriores a la poda, con la pluviometría acumulada (Luque *et al.*, 2014).

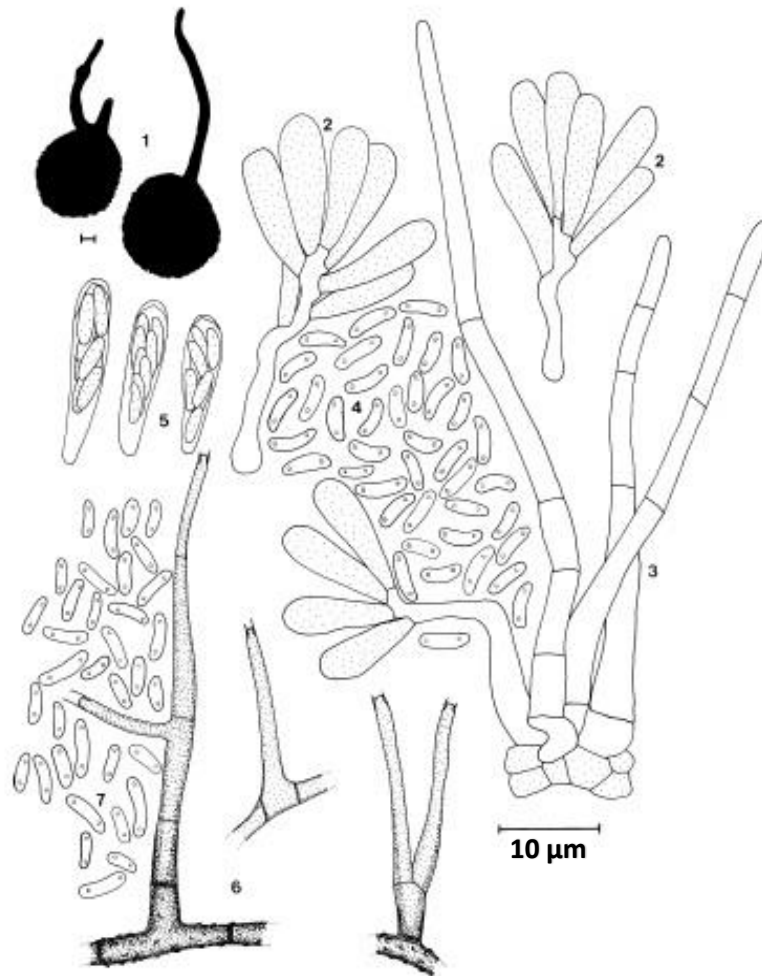
Aún así, para utilizar el momento de poda como un mecanismo para evitar el período de máximo riesgo de infecciones, éste momento debe estudiarse para cada zona vitivinícola de nuestro país (Luque *et al.*, 2014).

La existencia de un estado picnidial en este hongo es conocido, ya que ha sido obtenido a partir de la inoculación *in vitro* de *Pa. chlamydospora* en hojas de clavel y en madera de viña. En la naturaleza, la formación de picnidios se ha observado en viñedos australianos. Esporas aéreas de *Pa. chlamydospora* han sido encontradas a lo largo del año en viñas de Francia y California, pero el origen de este inóculo no ha sido confirmado (Crous y Gams, 2000). Baloyi et al. (2016), en la provincia de Western Cape (Sudáfrica) cogieron muestras de viñas que mostraban síntomas de decaimiento en mayo del 2011. Brazos, troncos, y restos de poda antiguos fueron observados al microscopio en el laboratorio y en estas muestras se encontraron picnidios en las hendiduras, grietas, en las heridas de poda y en la corteza de cepas de la variedad Pinotage de 35 años de edad. Agrupaciones de 1 a 50 picnidios fueron frecuentes en la superficie de la corteza. Los picnidios eran negros, globosos, y de hasta 175  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidióforos internos eran de color marrón claro, uniseptados o multiseptados, de 8 a 24 x 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ , las paredes de 1,5 a 3 x 1 a 2  $\mu\text{m}$  y los conidios hialinos, oblongo elipsoidales a aovados, de 1,5 a 2,5 x 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  (Baloyi et al., 2016).

### **1.3.2 *Phaeoacremonium minimum***

El micelio de este hongo consiste en hifas septadas ramificadas que aparecen por separado o en haces de hasta 25 hifas, tuberculadas con verrugas de hasta 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color marrón medio a pálido y 1–2.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Los conidióforos (Figura 5) son en su mayoría cortos, no ramificados, surgiendo de hifas aéreas o sumergidas, erectas, simples, hasta con 3 septos, a menudo con una única fiálida como célula apical, de color marrón pálido, más claras hacia la punta, lisas a verruculosas, de 15–46  $\mu\text{m}$  de largo y 1.5–2.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Fiálidas terminales o laterales, en su mayoría monofialídicas, lisas a verruculosas, subhialinas; con collarines 1–1.5  $\mu\text{m}$  de largo y 1.5–2  $\mu\text{m}$  de ancho. Conidios en su mayoría oblongo-elipsoidales o cilíndricos, ocasionalmente reniformes, de dimensiones 3–5 x 1–2  $\mu\text{m}$  (ratio longitud/anchura= 3) (Mostert et al., 2006).

Los peritecios de su forma sexual (*Togninia minima*) (Figura 5) se desarrollan principalmente agregados, a veces solitarios, en la superficie de la epidermis de la planta afectada o ligeramente sumergidos. Son subglobosos, a veces obpiriformes, de 160 a 420  $\mu\text{m}$  de diámetro y 200 a 400  $\mu\text{m}$  de alto. La pared está formada por dos regiones de *textura angularis*: la región exterior es de color marrón oscuro, con células más pequeñas y más redondeadas que las de la capa interna, aproximadamente 8-10 células y 20-40  $\mu\text{m}$  de espesor; la región interna es hialina hacia el centro y de color marrón pálido hacia la periferia, 5-7 células y 12-28  $\mu\text{m}$  de espesor; la superficie está cubierta de apéndices marrones de las hifas septadas que se convierten en hialinas hacia sus puntas. Los cuellos de los peritecios son de color negro, y hay de 1 a 3 por peritecio, cilíndricos, rectos a curvados, verrugosos, de 800 a 1800  $\mu\text{m}$  de largo, de 35 a 130  $\mu\text{m}$  de espesor en la base, y de 20 a 60  $\mu\text{m}$  de ancho en los ápices. Los cuellos a veces se dividen en dos, cerca del ápice; el ápice suele proliferar secundariamente hasta envejecer y entonces aparece noduloso; los nódulos (120  $\mu\text{m}$  de diámetro) también aparecen más abajo en el cuello. Los peritecios con múltiples cuellos suelen tener una pared delgada dividiendo la cámara del peritecio. Los parafisos son hialinos, septados, cilíndricos, estrechándose hacia la punta, de 45 a 125  $\mu\text{m}$  de largo, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho en la base y de 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  en el ápice, persistentes. Las ascas son hialinas, clavadas, con ápices claramente redondeados y con lados paralelos o estrechándose (17-27 x 4-5  $\mu\text{m}$ ); la región apical mide de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de espesor, con un anillo apical no amiloide. Las hifas ascogénicas son hialinas, ramificadas, con paredes lisas, bases remanentes de 5 x 2,5-4  $\mu\text{m}$ . Las ascosporas son aseptadas, hialinas, oblongo-elipsoidales a alantoides con finales redondeados, a veces conteniendo pequeños gúttulos al final, biseriadas, de 4,5 a 5 x 1 a 2  $\mu\text{m}$  (Mostert et al., 2006).



**Figura 5.** *Togninia minima* y su anamorfo *Phaeoacremonium minimum*. 1. Peritecio; 2. Ascas con disposición espigada en hifas ascogónicas; 3. Paráfisos; 4. Ascosporas; 5. Ascas; 6. Conidióforos y células conidiogénicas; 7. Conidias (Mostert *et al.*, 2003).

En el caso de *Pm. minimum*, en este hongo la presencia de los dos tipos de apareamiento garantiza la formación de peritecios de su teleomorfo, que pueden formarse fácilmente en campo bajo condiciones ambientales concretas. De hecho, los peritecios de *Pm. minimum* han sido observados en viñas en campo (Baloyi *et al.*, 2016). En los peritecios las ascosporas son liberadas después de hidratarse durante periodos de lluvia o bajo condiciones de riego por aspersión, e infectan las viñas a través de heridas de poda (Eskalen y Gubler, 2001). Los periodos de lluvia se han correlacionado con una mayor frecuencia en la liberación de esporas de *Pm. minimum* (Larignon y Dubos, 2000). Las esporas asexuales, conidios, de especies de *Phaeoacremonium* fueron capturadas en troncos y cordones de viñas de principio a mitad de verano en California o durante todo el periodo vegetativo en viñedos franceses. Varios estudios han mostrado que los conidios de *Pm. minimum* pueden infectar fácilmente heridas de poda y que las heridas de poda son particularmente vulnerables a la colonización por este hongo cuando se ha realizado una poda temprana (Gramaje *et al.*, 2015).

## **II.Objetivos**

## II. OBJETIVOS

En este trabajo se estudiarán las condiciones de temperatura para la formación de la fase sexual (teleomorfo) de *Phaeoacremonium minimum* y del sinanamorfo de *Phaeomoniella chlamydospora*. Para ello se evaluará la formación de ambas estructuras reproductivas a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C durante un mes y medio de incubación bajo luz continua. Para todas estas condiciones, se determinará el tiempo en que tardan en desarrollarse los peritecios de *Pm. minimum* y los picnidios de *Pa. chlamydospora*, y su abundancia. El objetivo final será obtener información sobre la biología de estos hongos, para mejorar el manejo de las enfermedades de la madera de la vid.

### **III.MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Aislados fúngicos utilizados

En este estudio se usaron dos aislados de *Pa. chlamydospora* y cuatro aislados de *Pm. minimum* (Tabla 2), todos ellos pertenecientes a la colección del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia y guardados a -80°C. Estos aislados fueron obtenidos de plantas que mostraban síntomas internos de enfermedad de Petri o yesca.

En el caso de los aislados pertenecientes a la especie *Pm. minimum*, éstos se eligieron para que representaran grupos de apareamiento complementarios (denominados A y B), de forma que en inoculaciones conjuntas se puede desarrollar la forma sexual (teleomorfo: *Togninia minima*), que produce ascosporas en peritecios. La información sobre los grupos de apareamiento de estos aislados se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Detalles de los aislados utilizados en este estudio.

Aislado	Año	Localidad	Provincia/Subpoblación	Variedad/Patrón	Tipo de apareamiento
Pch 106	2002	O Rosal	Pontevedra	-/196-17	-----
Pch 211	2004	Dos Barrios	Toledo	Tempranillo/41 B	-----
Pm 91	2007	Aielo de Malferit	Valencia	Tempranillo/110R	A
Pm 95	2007	Aielo de Malferit	Valencia	Tempranillo/110R	B
Pm 36	2002	Fernán Caballero	Ciudad Real	Tempranillo/110R	A
Pm 38	2002	San Clemente	Cuenca	Cabernet Sauvignon/SO4	B

#### III.2 Preparación de las suspensiones de esporas

Para obtener el inóculo, los aislados de la colección (Figura 6) se sembraron en Placas Petri con medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) con la adición de 0,5 g/l de sulfato de estreptomicina (PDAS) durante 15-20 días a 25 °C y en condiciones de oscuridad.





**Figura 6.** Cultivos en PDAS de a) aislado 91 de *Phaeoacremonium minimum*, b) aislado 95 de *Pm. minimum* y c) aislado 211 de *Phaeoconiella chlamydospora*.

Una vez crecidas las colonias de los hongos, se cubrían las placas Petri con agua estéril y se rascaba la superficie de las colonias con un asa para obtener una suspensión de esporas. Para ello, se utilizaron 4 placas de cada aislado para *Pa. chlamydospora* y se vertió el agua con las esporas en un matraz y se enrasó hasta los 200 ml con agua estéril. En el caso de los aislados de *Pm. minimum*, se utilizaron dos placas de cada uno de los aislados de parejas sexualmente complementarias (Pm36/Pm 38 y Pm91/Pm95), que se vertieron en un matraz enrasando luego con agua estéril hasta 200 ml.

### III.3 Inoculación de fragmentos de madera y condiciones de incubación

Se prepararon fragmentos de madera del patrón 110 R de 4 cm de longitud, que fueron partidos en dos mitades longitudinalmente y luego autoclavados tres veces a 120 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se prepararon seis placas de medio de cultivo agar agua (AA –15 g Agar/1000 ml agua) por cada combinación de aislado de *Pa. chlamydospora* y por cada pareja de *Pm. minimum*, y para las distintas temperaturas de incubación previstas en el estudio: 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C.

Para la inoculación se procedió del siguiente modo: en cada placa se colocaron dos fragmentos de madera. Después, se pipetearon 100 µl de suspensión de esporas sobre cada fragmento de madera, y se dejaron incubar las placas a 25° C en oscuridad durante dos semanas para facilitar la completa colonización de los fragmentos de madera.

Después de este tiempo de incubación a 25 °C, cada grupo de placas correspondiente a las diferentes especies fúngicas y aislados o parejas incluidos en el estudio se incubó bajo luz blanca continua a las distintas temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) durante aproximadamente un mes y medio según lo descrito por (Gramaje *et al.*, 2013; Mostert *et al.*, 2003) (Figura 7). El experimento se repitió.



**Figura 7.** Placas Petri con fragmentos de madera e inoculadas con los hongos del estudio, depositadas en un incubador bajo luz blanca continua.

### III.4 Evaluación

Durante el tiempo de incubación a las diferentes temperaturas, se realizaron cuatro evaluaciones, observando bajo la lupa si había presencia o se estaban formando picnidios del sinanamorfo de *Pa. chlamydospora* o peritecios en *Pm. minimum*. Estas evaluaciones se realizaron a los 14, 21, 28 y 42 días desde que se inició la incubación en luz continua a las diferentes temperaturas, siendo la cuarta evaluación la última.

En la última evaluación se tomaron 5 placas por cada aislado (*Pa. chlamydospora*) y/o pareja complementaria de *Pm. minimum*), temperatura, y repetición. En este momento, se realizó una nueva observación bajo la lupa, pero en este caso asignando un valor a cada fragmento de madera según el porcentaje de superficie ocupado por picnidios o peritecios (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valor asignado según el porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del sinanamorfo de *Pa. chlamydospora* o peritecios de *Pm. minimum*.

<b>0</b>	Sin picnidios o peritecios
<b>1</b>	Picnidios o peritecios escasos, ocupando menos del 25 % de la superficie
<b>2</b>	Picnidios o peritecios frecuentes, ocupando del 25 al 75 % de la superficie
<b>3</b>	Picnidios o peritecios abundantes, ocupando más del 75 % de la superficie

### **III.5 Análisis estadístico de los datos**

Los niveles de significación para los resultados de la última evaluación se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la separación de medias se realizó con el test “Least Significant difference” (LSD) de Fisher ( $P < 0.05$ ). El análisis se realizó utilizando el paquete agricolae del software R (versión 3.4.3).

## **IV. Resultados y Discusión**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se observó bajo lupa si para cada pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* había presencia en los fragmentos de madera de peritecios del teleomorfo (forma sexual de este hongo): aislados 36/38 (Tabla 4) y aislados 91/95 (Tabla 5). En el caso de *Pa. chlamyospora*, se observó la presencia de picnidios del sinanomorfo para los aislados 211 (Tabla 6) y 106 (Tabla 7). Para mostrar estos resultados, se realizó una tabla para cada aislado o pareja sexualmente complementaria, en la que se muestra para las distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) si había presencia (+) o no (-) de peritecios para *Pm. minimum* o de picnidios de *Pa. chlamyospora* en los cuatro momentos de evaluación.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 4), para la temperatura de 10°C no hubo presencia de peritecios en ninguna de las cuatro evaluaciones. En las temperaturas de 15 y 20°C no se observaron peritecios en la primera evaluación, pero sí a partir de la segunda evaluación. A la temperatura de 25°C de incubación no hubo presencia de peritecios en las dos primeras evaluaciones, siendo a partir de la tercera evaluación cuando se detectó la presencia de peritecios. A las temperaturas de 5 y 30°C no se observaron peritecios hasta la última evaluación, siendo éstos muy escasos.

**Tabla 4.** Presencia de peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).

	Temperatura	1ª Evaluación	2ª Evaluación	3ª Evaluación	4ª Evaluación
Pm 36/38	5	-	-	-	+
	10	-	-	-	-
	15	-	+	+	+
	20	-	+	+	+
	25	-	-	+	+
	30	-	-	-	+

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 5), para las temperaturas de 5 y 10 no hubo presencia de peritecios en ninguna de las cuatro evaluaciones. En las temperaturas de 15 y 20°C no se observaron peritecios en la primera evaluación, pero sí a partir de la segunda evaluación. A la temperatura de 25°C de incubación no hubo presencia de peritecios en las dos primeras evaluaciones, siendo a partir de la tercera evaluación cuando se detectó la presencia de peritecios. A la temperatura de 30°C no se observaron estructuras hasta la última evaluación, siendo éstas muy escasas.

**Tabla 5.** Presencia de peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).

	Temperatura	1ª Evaluación	2ª Evaluación	3ª Evaluación	4ª Evaluación
Pm 91/95	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	15	-	+	+	+
	20	-	+	+	+
	25	-	-	+	+
	30	-	-	-	+

Para el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 6), para las temperaturas de 5, 10 y 30°C no hubo presencia de picnidios en ninguna de las cuatro evaluaciones. En las temperaturas de 15 y 20°C no hubo presencia de picnidios en la primera evaluación, pero sí a partir de la segunda evaluación. A la temperatura de 25°C no se observaron picnidios en las dos primeras evaluaciones, siendo a partir de la tercera evaluación cuando ya hubo presencia de picnidios.

**Tabla 6.** Presencia de picnidios del aislado 211 de *Phaeoacremonium chlamydospora* a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).

	Temperatura	1ª Evaluación	2ª Evaluación	3ª Evaluación	4ª Evaluación
Pch 211	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	15	-	+	+	+
	20	-	+	+	+
	25	-	-	+	+
	30	-	-	-	-

Para el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 7) para la temperatura de 30°C no hubo presencia de picnidios en ninguna de las cuatro evaluaciones. En las temperaturas de 15 y 20°C no hubo presencia de picnidios en la primera evaluación, pero sí a partir de la segunda evaluación. A la temperatura de 25°C no se observaron picnidios en las dos primeras evaluaciones, siendo a partir de la tercera evaluación cuando ya hubo presencia de picnidios. A 5 y 10°C no se observaron picnidios hasta la última evaluación, siendo éstos muy escasos.

**Tabla 7.** Presencia de picnidios del aislado 106 de *Phaeoconiella chlamydospora* a distintas temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) en cuatro momentos de evaluación (14, 21, 28 y 42 días desde el inicio de la incubación).

	Temperatura	1ª Evaluación	2ª Evaluación	3ª Evaluación	4ª Evaluación
Pch 106	5	-	-	-	+
	10	-	-	-	+
	15	-	+	+	+
	20	-	+	+	+
	25	-	-	+	+
	30	-	-	-	-

En la última evaluación, para cada aislado de *Pa. chlamydospora* o pareja de *Pm. minimum*, se evaluó la abundancia de picnidios y peritecios, respectivamente en 5 placas por cada temperatura de incubación (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) y repetición. Para ello, a cada fragmento de madera se asignó un valor (en la escala de 0 a 3 descrita anteriormente), según el porcentaje de superficie ocupado por picnidios o peritecios. Además, con los valores obtenidos se calculó el promedio para cada repetición y el promedio de las dos repeticiones. A continuación, se exponen los resultados ordenados por temperaturas.

A 5°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 8), en la repetición 1 solo hubo un fragmento de madera con un valor de abundancia de peritecios de 1, siendo el resto 0. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron un valor de 0. El promedio de la repetición 1 fue 0,1 y de la repetición 2 fue de 0. El promedio total fue 0,05.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 9), para la temperatura de 5°C en la repetición 1 y en la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron un valor de 0. El promedio de la repetición 1 y de la repetición 2 fue de 0. El promedio total fue 0.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 10), para la temperatura de 5°C en la repetición 1 todos los fragmentos no presentaron picnidios y, por tanto, tuvieron un valor 0 de abundancia. En la repetición 2 solo hubo un fragmento de madera con un valor de 1, siendo el resto 0. El promedio de la repetición 1 fue de 0 y de la repetición 2 fue 0,1. El promedio total fue 0,05.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 11), para la temperatura de 5°C en la repetición 1 y 2 todos los fragmentos no presentaron picnidios y, por tanto, tuvieron un valor 0 de abundancia. El promedio de la repetición 1 y de la repetición 2 fue 0. El promedio total fue 0.

A 10°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 12), en la repetición 1 no hubo presencia de peritecios en los fragmentos de madera, siendo el valor asignado 0. En la repetición 2 el valor de todos los fragmentos también fue 0. Por tanto, todos los promedios fueron cero.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 13), para la temperatura de 10°C en la repetición 1 y en la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron un valor de 0. El promedio de la repetición 1 y de la repetición 2 fue de 0. El promedio total fue 0.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 14), para la temperatura de 10°C en la repetición 1 todos los fragmentos tuvieron valor 0. En la repetición 2 solo se encontró un fragmento de madera con un valor de 1, siendo el resto 0. El promedio de la repetición 1 fue 0 y de la repetición 2 fue 0,1. El promedio total fue 0,05.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 15), para la temperatura de 10°C en la repetición 1 y 2 todos los fragmentos no presentaron picnidios y, por tanto, tuvieron un valor 0 de abundancia. El promedio de la repetición 1 y de la repetición 2 fue 0. El promedio total fue 0.

A 15°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 16), para la repetición 1 el valor de todos los fragmentos de madera fue 1. En la repetición 2 el valor de todos los fragmentos de madera fue 1. El promedio de las dos repeticiones fue 1 y también el promedio total.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 17), para la temperatura de 15°C en la repetición 1 hubo 2 fragmentos de madera cuyo valor de abundancia de peritecios fue 2, siendo el valor del resto 1. En la repetición 2 hubo un fragmento con valor 2, siendo el resto 1. El promedio de la repetición 1 fue 1,2 y de la repetición 2 fue 1,1. El promedio total fue 1,15.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 18), para la temperatura de 15°C en la repetición 1 todos los fragmentos mostraron un valor 1. En la repetición 2 solo hubo un fragmento de madera con un valor de 0, siendo el resto 1. El promedio de la repetición 1 fue 1 y de la repetición 2 fue 0,88. El promedio total fue 0,94.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 19), para la temperatura de 15°C en la repetición 1 solo hubo un fragmento de madera con un valor de 0 de abundancia de picnidios, siendo el resto 1. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron valor 1. El promedio de la repetición 1 fue de 0,9 y de la repetición 2 fue 1. El promedio total fue 0,95.

A 20°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 20) para la temperatura de 20°C en la repetición 1 el valor de todos los fragmentos de madera fue 2, menos un fragmento que presentó un valor 1. En la repetición 2 hubo un fragmento con valor 3, siendo el resto 2. El promedio de la repetición 1 fue de 1,9 y de la repetición 2 fue 2,1. El promedio total fue 2.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 21), para la temperatura de 20°C en la repetición 1 el valor de abundancia de peritecios de todos los fragmentos de madera fue 3, menos 3 fragmentos en los que fue 2. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron valor 3, excepto un fragmento que tenía una abundancia de valor 2. El promedio de la repetición 1 fue 2,7 y de la repetición 2 fue 2,9. El promedio total fue 2,8.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 22), para la temperatura de 20°C en la repetición 1 hubo un fragmento de madera con un valor de abundancia de picnidios de 0, 2 fragmentos, asignándosele un valor de 2 y al resto 1. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron valor 1. El promedio de la repetición 1 fue 1,1 y de la repetición 2 fue 1. El promedio total fue 1,05.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 23), para la temperatura de 20°C en la repetición 1 hubo un fragmento de madera con un valor de 1 y el resto de 2. En la repetición 2 hubo 4 fragmentos de madera con valor de 1 y el resto 2. El promedio de la repetición 1 fue 1,9 y de la repetición 2 fue 1,6. El promedio total fue 1,75.



A la temperatura de 25°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 24), para la repetición 1 el valor de abundancia de peritecios en todos los fragmentos de madera fue 2, excepto en 2 fragmentos a los que se asignó un valor de 1. En la repetición 2 el valor de todos los fragmentos de madera fue 2, excepto 2 fragmentos que tuvieron valor 1. El promedio de las dos repeticiones fue 1,8. El promedio total fue 1,8.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 25), para la temperatura de 25°C en la repetición 1 el valor de la mitad de los fragmentos de madera fue de 2 y la otra mitad 3. En la repetición 2 el valor de abundancia de peritecios en todos los fragmentos de madera fue 3. El promedio de la repetición 1 fue 2,5 y de la repetición 2 fue 3. El promedio total fue 2,75.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 26), para la temperatura de 25°C en la repetición 1 hubo 4 fragmentos de madera con un valor de abundancia de picnidios de 2, y el resto 1. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron valor 1, excepto un fragmento de madera al que se asignó un valor de 2. El promedio de la repetición 1 fue 1,4 y de la repetición 2 fue 1,13. El promedio total fue 1,27.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 27), para la temperatura de 25°C en la repetición 1 hubo dos fragmentos de madera con un valor de 2, dos fragmentos con valor 2 y el resto de los fragmentos tuvieron valor 1. En la repetición 2 hubo tres fragmentos de madera con un valor de 1, dos fragmentos con valor 3 y el resto 5. El promedio de la repetición 1 fue 1,6 y de la repetición 2 fue 1,9. El promedio total fue 1,75.

A 30°C, en la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 (Tabla 28) para la temperatura de 30°C en la repetición 1 solo hubo un fragmento de madera con un valor de 1, teniendo el resto 0. En la repetición 2 todos los fragmentos tuvieron valor 0. El promedio de la repetición 1 fue 0,1 y de la repetición 2 fue 0. El promedio total fue 0,05.

En la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 91/95 (Tabla 29), para la temperatura de 30°C en la repetición 1 todos los fragmentos tuvieron valor 0. En la repetición 2 solo dos fragmentos de madera tenían un valor de 1, teniendo el resto 0. El promedio de la repetición 1 fue 0 y de la repetición 2 fue 0,25. El promedio total fue 0,13.

En el aislado 106 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 30) para la temperatura de 30°C en la repetición 1 todos los fragmentos mostraron valor 0, sin presencia de picnidios. En la repetición 2 todos los fragmentos también tuvieron valor 0. El promedio de las repeticiones y el promedio total fueron 0.

En el aislado 211 de *Pa. chlamydospora* (Tabla 31), para la temperatura de 30°C en la repetición 1 y 2 todos los fragmentos no presentaron picnidios y, por tanto, tuvieron un valor 0 de abundancia. El promedio de la repetición 1 y de la repetición 2 fue 0. El promedio total fue 0.

**Tabla 8.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0,1		Promedio	0	
		Promedio		0,05	

**Tabla 9.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

**Tabla 10.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	1	0
Promedio	0		Promedio	0,1	
		Promedio		0,05	

**Tabla 11.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 5°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

**Tabla 12.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

**Tabla 13.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

**Tabla 14.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	1
Promedio	0		Promedio	0,1	
	Promedio			0,05	

**Tabla 15.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 10°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
	Promedio			0	

**Tabla 16.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	1	1
3	1	1	3	1	1
4	1	1	4	1	1
5	1	1	5	1	1
Promedio	1		Promedio	1	
	Promedio			1	

**Tabla 17.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	1	1
3	1	2	3	1	2
4	1	1	4	1	1
5	2	1	5	1	1
Promedio	1,2		Promedio	1,1	
	Promedio		1,15		

**Tabla 18.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	0	1
3	1	1	3	1	1
4			4	1	1
5			5		
Promedio	1		Promedio	0,88	
	Promedio		0,94		

**Tabla 19.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 15°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	1	1	1	1
2	1	1	2	1	1
3	1	1	3	1	1
4	1	1	4	1	1
5	1	1	5	1	1
Promedio	0,9		Promedio	1	
	Promedio		0,95		

**Tabla 20.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	2	2	1	2	2
2	2	1	2	2	2
3	2	2	3	2	3
4	2	2	4	2	2
5	2	2	5	2	2
Promedio	1,9		Promedio	2,1	
	Promedio			2	

**Tabla 21.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	3	3	1	3	3
2	2	2	2	3	3
3	3	3	3	3	2
4	3	2	4	3	3
5	3	3	5	3	3
Promedio	2,7		Promedio	2,9	
	Promedio			2,8	

**Tabla 22.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	2	1	1	1
2	1	1	2	1	1
3	0	1	3	1	1
4	1	1	4	1	1
5	1	2	5	1	1
Promedio	1,1		Promedio	1	
	Promedio			1,05	

**Tabla 23.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 20°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	2	2	1	2	2
2	2	2	2	1	2
3	2	2	3	2	1
4	2	2	4	1	1
5	2	1	5	2	2
Promedio	1,9		Promedio	1,6	
		Promedio		1,75	

**Tabla 24.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	2	2	1	2	2
2	1	2	2	2	2
3	1	2	3	2	2
4	2	2	4	1	2
5	2	2	5	2	1
Promedio	1,8		Promedio	1,8	
		Promedio		1,8	

**Tabla 25.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	3	3	1	3	3
2	3	2	2	3	3
3	2	2	3	3	3
4	3	2	4	3	3
5	3	2	5	3	3
Promedio	2,5		Promedio	3	
		Promedio		2,75	

**Tabla 26.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	2	1	1	2
2	1	2	2	1	1
3	2	2	3	1	1
4	1	1	4	1	1
5	1	1	5		
Promedio	1,4		Promedio	1,13	
	Promedio			1,27	

**Tabla 27.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 25°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	1	1	1	2	3
2	1	1	2	3	2
3	3	3	3	2	2
4	1	2	4	1	1
5	1	2	5	2	1
Promedio	1,6		Promedio	1,9	
	Promedio			1,75	

**Tabla 28.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	1	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0,1		Promedio	0	
	Promedio			0,05	



**Tabla 29.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 91/95 (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	1	1
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5		
Promedio	0		Promedio	0,25	
		Promedio		0,13	

**Tabla 30.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación.

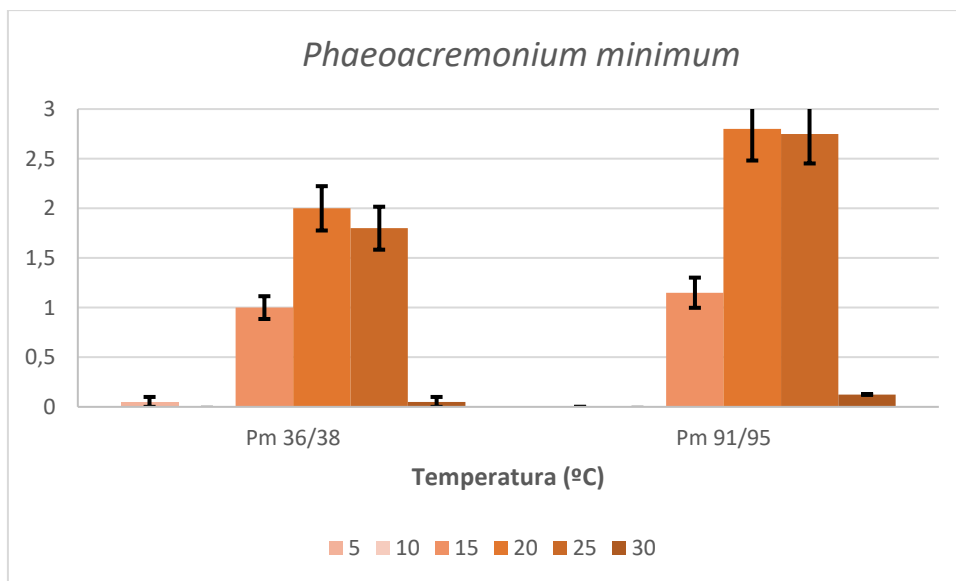
Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

**Tabla 31.** Porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) y su promedio a 30°C, tras 42 días de incubación.

Placa	Repetición 1		Placa	Repetición 2	
	Fragmento			Fragmento	
	1	2		1	2
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5		
Promedio	0		Promedio	0	
		Promedio		0	

En la Figura 8 se muestra el promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de las parejas sexualmente complementarias de *Pm. minimum* 36/38 y 91/95 (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C.

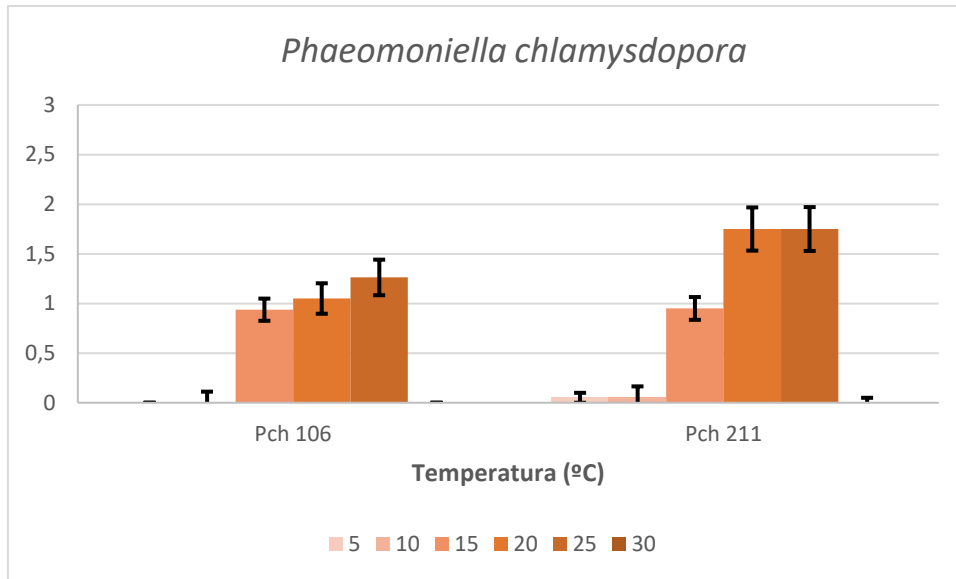
En la Figura 8 se puede ver cómo para las parejas sexualmente complementarias de *Pm. minimum* 36/38 y 91/95 a las temperaturas de 5, 10 y 30°C los valores de producción de peritecios son prácticamente nulos. Los valores máximos se obtuvieron a 20°C, siendo el promedio de 2,0 para la pareja sexualmente complementaria de *Pm. minimum* 36/38 y 2,8 para la pareja 91/95.



**Figura 8.** Promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de la pareja sexualmente complementaria de *Phaeoacremonium minimum* 36/38 y 91/95 (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las barras representan el error estándar de los promedios.

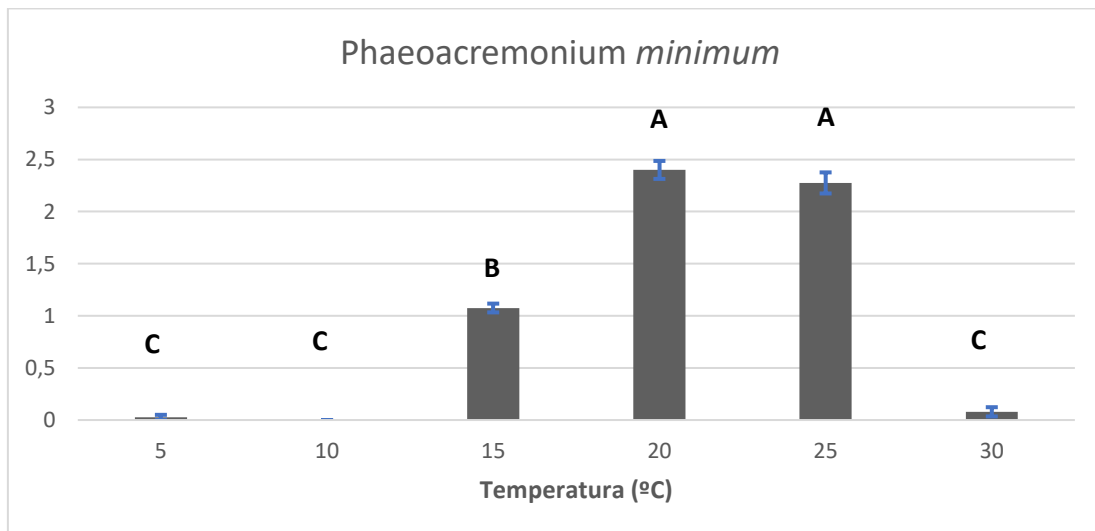
En la Figura 9 se muestra el promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios de los aislados 106 y 211 de *Pa. chlamydospora* (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C.

En la Figura 9 se observa cómo para los aislados 106 y 211 de *Pa. chlamydospora* a las temperaturas de 5, 10 y 30°C los valores de producción de picnidios son prácticamente nulos. El valor máximo para el aislado 106 se obtuvo a 25°C, siendo el promedio 1,27, y para el aislado 211 a 20 y 25°C se obtuvo el mismo valor de 1,75.



**Figura 9.** Promedio de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios del aislado 106 y 211 de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las barras representan el error estándar de los promedios.

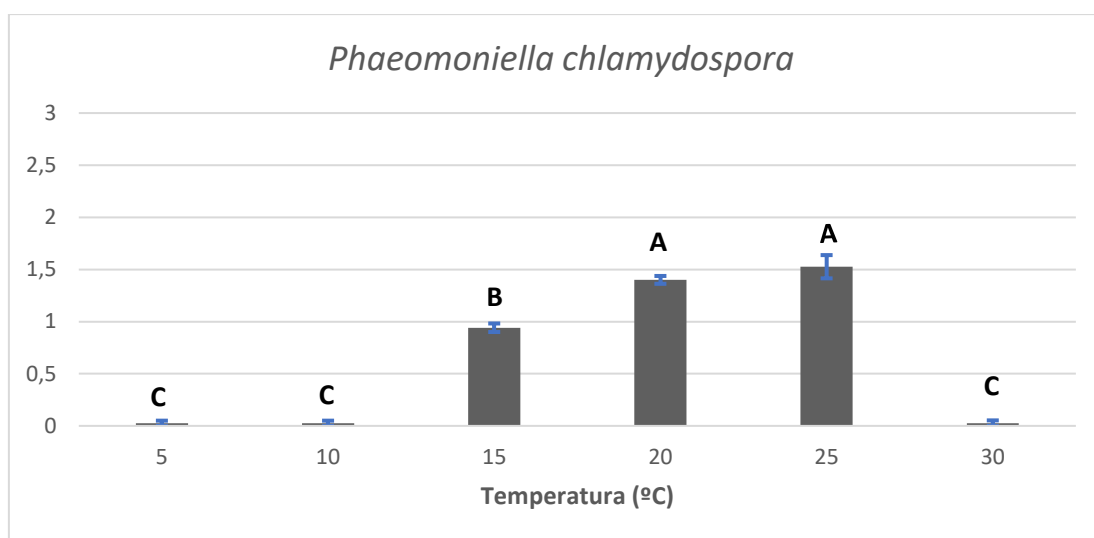
Al realizar el análisis estadístico de los resultados para *Pm. minimum*, no se observaron diferencias significativas entre las dos parejas sexualmente complementarias estudiadas (Figura 10). Por tanto, se agruparon todos los datos y al realizar el análisis se observó un efecto significativo de la temperatura en la producción de peritecios.



**Figura 10.** Promedios de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de *Phaeoacremonium minimum* (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las letras iguales representan que los valores no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar de los promedios.

En la Figura 10 se puede ver que para *Pm. minimum* a las temperaturas de formación de 20 y 25°C se observó una formación significativamente superior de peritecios (2,4 y 2,28, respectivamente) comparado con las otras temperaturas estudiadas. No existiendo diferencias significativas entre ellas. A 15°C se obtuvo un promedio de 1,08 representando un valor intermedio y a 5, 10 y 15°C el promedio es prácticamente nulo.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados para *Pa. chlamydospora*, no se observaron diferencias significativas entre los dos aislados estudiados (Figura 11). Por tanto, se agruparon todos los datos y al realizar el análisis se observó un efecto significativo de la temperatura en la producción de picnidios.



**Figura 11.** Promedios de los valores asignados al porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios de *Phaeomoniella chlamydospora* (escalado de 0 a 3) para las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C. Las letras iguales representan que los valores no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar de los promedios.

En la Figura 11 se puede ver que para *Pa. chlamydospora* a las temperaturas de 20 y 25°C se observó una formación significativamente superior de picnidios (1,4 y 1,53, respectivamente) comparado con otras temperaturas estudiadas. A 15°C se obtuvo un promedio de 0,94 representando un valor intermedio y a 5, 10 y 15°C el promedio es prácticamente nulo.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en este estudio, podemos ver, a partir de los resultados mostrados en las Tablas 4 y 5, que se formaron peritecios de *Pm. minimum* a las temperaturas de 15, 20 y 25°C. Los resultados obtenidos para 20 y 25°C concuerdan con los obtenidos por Mostert *et al.* (2006), que, para este hongo, obtuvieron peritecios *in vitro* sobre fragmentos de madera en agar agua a 22°C bajo condiciones de luz continua.

Respecto a *Pa. chlamydospora*, según lo observado en las Tablas 6 y 7, se formaron picnidios de este hongo a las temperaturas de 15, 20 y 25°C. Crous y Gams (2000), observaron el sinanamorfo tipo *Phoma* de este hongo en fragmentos de madera infectados en agar con

hojas de clavel (CLA) a 10°C bajo luz ultravioleta cercano. Estas condiciones de incubación no coinciden con las utilizadas en nuestro estudio, lo que podría explicar los diferentes resultados obtenidos.

Otro objetivo de este trabajo fue ver la rapidez en la formación de las estructuras reproductivas (peritecios para *Pm. minimum* y picnidios para *Pa. chlamydospora*), para aquellas temperaturas en las que estos cuerpos fructíferos se produjeron.

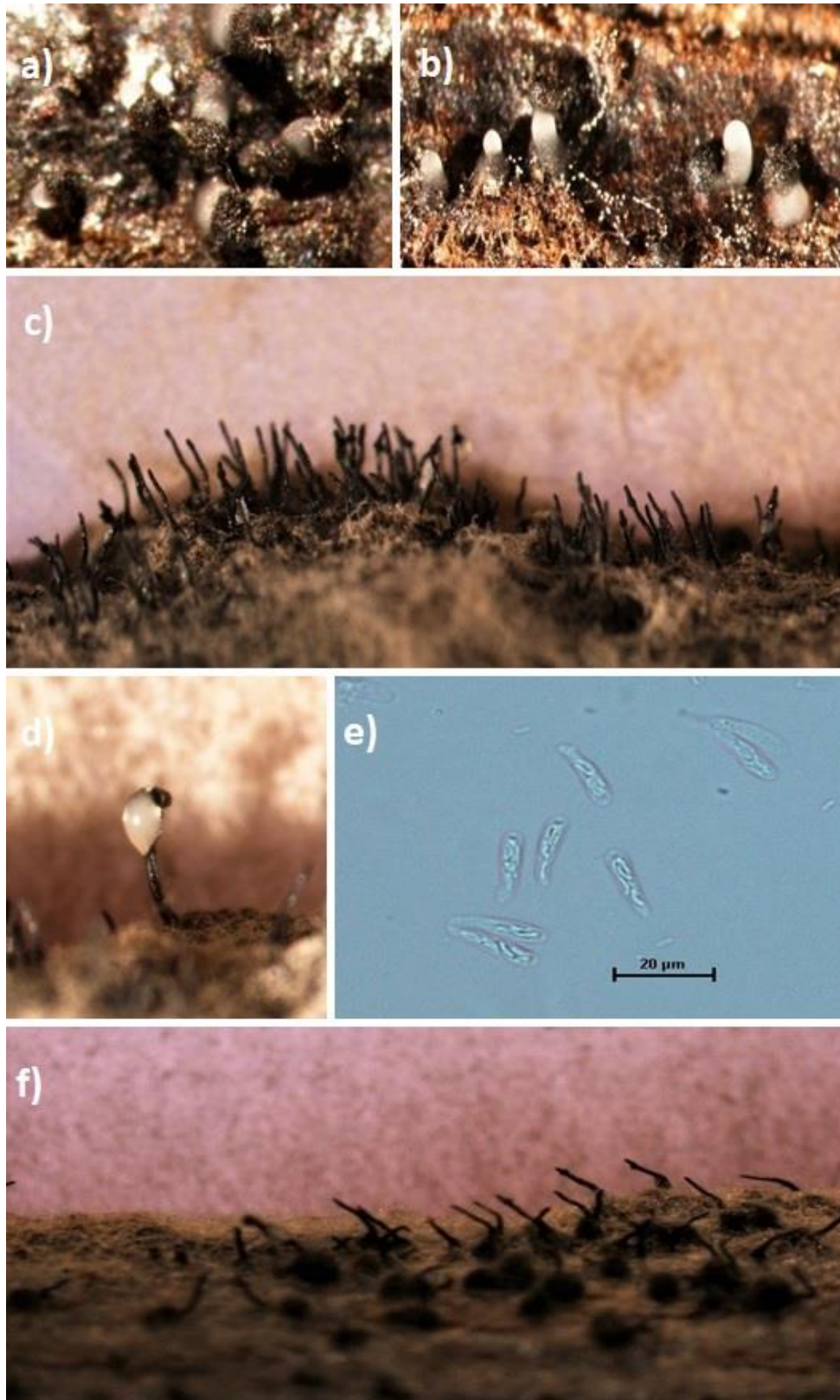
En las Tablas 4 y 5, se puede ver que a 15 y 20°C ya hubo peritecios formados de *Pm. minimum* en la segunda evaluación (21 días de incubación en luz continua), y en la tercera evaluación (28 días de incubación en luz continua) también a 25°C. Mientras que a 10°C no se observó ninguna estructura en las evaluaciones, a 5 y 30°C se observaron estructuras muy escasas en la última evaluación (42 días de incubación en luz continua). El promedio de porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por peritecios de las parejas sexualmente complementarias de *Pm. minimum* (en la escala de 0 a 3) fue mayor a 20°C (2,4), seguido por 25°C (2,28) y a 15°C (1,08). Que los peritecios se observaran a 20°C en la segunda fecha de evaluación, y a 25°C en la tercera fecha de evaluación coincide con lo descrito por Mostert *et al.* (2006) que observaron que se formaron peritecios *in vitro* después de 2-3 semanas de incubación en fragmentos de madera en agar agua a 22°C bajo condiciones de luz continua y con lo descrito por Narmani *et al.* (2014), que con aislados de *Pm. minimum* procedentes de vides en Irán observaron que los peritecios se formaron después de 3-4 semanas tras el apareamiento e incubación.

En cuanto a *Pa. chlamydospora* en las Tablas 6 y 7, se observa que a 15 y 20°C ya hubo picnidios formados (Figura 12) de este hongo en la segunda evaluación (21 días de incubación en luz continua), y en la tercera evaluación (28 días de incubación en luz continua) también a 25°C. Mientras que a 30°C no se observaron estructuras formadas en ninguna evaluación, a 5 y 10°C se observó estructuras muy escasas en la última evaluación (42 días de incubación en luz continua). El promedio de porcentaje de superficie del fragmento de madera ocupado por picnidios de *Pa. chlamydospora* (en la escala de 0 a 3) fue mayor a 25°C (1,51), seguido del valor obtenido a 20°C (1,4) y a 15°C (0,94).

El hecho de que los peritecios de *Pm. minimum* se formen en mayor cantidad a temperaturas de 20 y 25°C concordaría con lo descrito por Rooney-Latham *et al.* (2005), que detectaron peritecios en el verano del 2004 en viñedos localizados en cinco condados diferentes en California tanto en cultivares de uva para vinificación como de uva de mesa.

Se observaron al microscopio los picnidios de *Pa. chlamydospora*, así como los exudados, y se comprobó que en el interior de los picnidios había conidios y que los exudados eran masas de conidios. Los pocos picnidios formados a 5 y 10°C ni presentaban exudados, ni contenían conidios en su interior.

Se hicieron preparaciones al microscopio de los peritecios (Figura 12) obtenidos para observarlos al microscopio y comprobar que estas estructuras estaban completamente maduras y en nuestras condiciones de incubación se habían producido ascas y ascosporas en su interior. Se comprobó que los peritecios obtenidos de las parejas sexualmente complementarias de *Pm. minimum* 91/95 y 36/38 a 15, 20 y 25°C contenían ascas completamente maduras con ascosporas en su interior (Figura 12). Las escasas estructuras observadas a 5°, 10° y 30°C presentaban peritecios con cuellos más cortos de los observados a las otras temperaturas de incubación. Estas estructuras también fueron observadas al microscopio, pero a diferencia de los peritecios desarrollados a 15, 20 y 25°C, no contenían ascas en su interior.



**Figura 12.** a) b) Picnidios de *Phaeomoniella chlamydospora* exudando una masa de conidios. c) d) f) Peritecios de *Phaeoacremonium minimum* formados en la superficie de los fragmentos de madera, algunos de ellos exudando ascosporas. e) Ascas de *Phaeoacremonium minimum* con ascosporas en su interior. Barra de escala = 20 µm.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nueva información sobre las condiciones de temperatura y el tiempo necesario para el desarrollo de las estructuras reproductivas de los hongos *Pa. chlamydospora* y *Pm. minimum*. Estas estructuras son importantes ya que las esporas (conidios o ascosporas, respectivamente), constituyen una importante fuente de inóculo aéreo que está directamente asociado a la infección de las plantas a través de las heridas de poda a finales de otoño o invierno (Agustí-Brisach *et al.*, 2015; Armengol, 2017; Gramaje *et al.*, 2018). Además, la información obtenida puede ser incorporada a modelos epidemiológicos de predicción del riesgo de infección para estos hongos en viñedo que actualmente se están desarrollando.

## **V.Conclusiones**



## V. CONCLUSIONES

- A las temperaturas de 15, 20 y 25°C, tanto para *Phaeoacremonium minimum* y *Phaeoconiella chlamydospora* se obtuvo una producción significativamente mayor de estructuras reproductivas fértiles (peritecios y picnidios, respectivamente). Para ambos hongos los cuerpos fructíferos se desarrollaron después de 21 días de incubación a luz continua para 15 y 20°C, y después de 28 días a 25°C.
- A las temperaturas de 5, 10 y 30°C. la presencia de picnidios y peritecios fue muy escasa y no se observó que produjeran conidios o ascosporas, respectivamente.

## **VI. Bibliografía**

## 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.

ARMENGOL, J. (2017) Epidemiología de los hongos de la madera de la vid: ¿cómo sobreviven, se dispersan e infectan a las plantas? *Phytoma España*, 288: 43-45.

BALOYI, M. A.; HALLEN, F.; MOSTERT, L.; ESKALEN, A. (2016). First report of *Phaeoconiella chlamydospora* pycnidia as Petri disease inoculum sources in South African vineyards. *APS Journals*, 100: 2528.

BASKARATHEVAN, J.; JASPERS, M.; JONES, E.; RIDGWAY, H. (2012) Development of isolate-specific markers for *Neofusicoccum parvum* and *N. luteum* and their use to study rainwater splash dispersal in the vineyard. *Plant Pathology*, 62: 501-509.

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.

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

DE LA FUENTE, M. (Editor). (2016) Grapevine trunk diseases. A review. Edita OIV (Organización Internacional de la viña y del Vino). París. 24 pp.

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

ESKALEN, A., GUBLER, W. D. (2001) Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes* and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 429-432.

GRAMAJE, D.; 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.; ARMENGOL, J.; RIDGWAY, H. J. (2013) Genetic and virulence diversity, and mating type distribution of *Togninia minima* causing grapevine trunk diseases in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 727-743.

GRAMAJE, D.; 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.; 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.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SOSNOWSKI, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant disease*, 102:12-39
- KUBÁTOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; PAŽOUTOVÁ, S. (2004) *Phaeoacremonium rubrigenum* - Hyphomycete associated with bark beetles found in Czechia. *Folia Microbiologica*, 49: 99-104.
- LARIGNON, P.; DUBOS, B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 184-189.
- 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. Madrid. 201 pp.
- MAPA (2019). Vitivinicultura - Producciones agrícolas - Agricultura. Mapa.gob.es. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/> [Visto el 14 de junio de 2019].
- MONDELLO, V.; SONGY, A.; BATTISTON, E.; PINTO, C.; COPPIN, C.; TROTEL-AZIZ, P.; CLÉMENT, C.; MUGNAI, L.; FONTAINE, F. (2018) Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant disease*, 102: 1189–1217.
- MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; GAMS, W.; SUMMERBELL, R. C. (2003). *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- MOSTERT, L.; GROENEWALD, J. Z.; SUMMERBELL, R. C.; GAMS, W.; CROUS, P. W. (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in mycology*, 54: 1-113.
- MOYO, P.; ALLSOPP, E.; ROETS, F.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F. (2014) Arthropods vector Grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology*, 104:1063-1069.
- NARMANI, A.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A. (2014) Induction of sexual reproduction and determination of mating types in *Phaeoacremonium aleophilum*, the causal agent of esca disease of grapevine in East Azarbaijan province. *Iran Journal of Plant Pathology*, 50: 135-137.