



Muestreo e identificación de hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid en Lanzarote (Canarias)

M. PÉREZ MÁRQUEZ, M. LEÓN SANTANA, A. RAMÓN ALBALAT, J. ARMENGOL FORTÍ
Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Valencia.

RESUMEN

Se ha realizado un muestreo e identificación de hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid en Lanzarote. Para ello, se recogieron 15 muestras de plantas de vid que presentaban síntomas característicos de estas enfermedades en viñedos de diferentes localizaciones y variedades. Se realizaron aislamientos fúngicos y, posteriormente, se realizó la identificación de las colonias obtenidas mediante métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos universales y la secuenciación de diferentes regiones génicas. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de: *Diaporthe ampelina*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* y *Pm. parisiticum*. Este estudio cita por primera vez estos hongos en plantas de vid con síntomas asociados a enfermedades de la madera en Lanzarote y, en general, en las Islas Canarias.

Palabras clave: Botryosphaeriaceae, *Diaporthe*, Hongos de la madera, *Phaeoacremonium*, *Phaeoconiella*.

ABSTRACT

Survey and identification of fungi associated with grapevine trunk diseases. A survey and identification of fungal species associated with grapevine trunk diseases was conducted in vineyards located at Lanzarote island. Fifteen samples of grapevine plants showing typical symptoms of fungal trunk diseases were collected in different vineyards. Fungal isolations were performed from these samples and, subsequently, the identification of the colonies was completed by molecular methods based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) with universal oligonucleotides and sequencing of different gene regions. The results confirmed the presence of: *Diaporthe ampelina*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* and *Pm. parisiticum*. This study reports for the first time these fungi in grapevine plants showing trunk disease symptoms on the island of Lanzarote and, in general, in the Canary Islands.

Key words: Botryosphaeriaceae, *Diaporthe*, *Phaeoacremonium*, *Phaeoconiella*, Fungal trunk pathogens.

El cultivo masivo del viñedo en Lanzarote data del siglo XVIII, localizándose la mayor superficie de cultivo en la zona centro-meridional de la isla, donde alcanza una extensión de aproximadamente 200 km² y conforma un espacio que recibe el nombre de La Geria (GONZÁLEZ MORALES *et al.*, 2002).

La ceniza volcánica o lapilli, conocida como rofe en Lanzarote, se utiliza como elemento principal para recubrir el suelo en toda la isla. El rofe actúa como reserva de la humedad proveniente del rocío, evita la erosión de los suelos, aporta una gran riqueza en minerales, e impide la evaporación de la humedad. Además, su color negro absorbe más radiación solar, por lo que incrementa la temperatura del suelo frente a la atmosférica. Esta mayor temperatura facilita el desarrollo de las plantas de vid e incrementa el grado de azúcares en las uvas y, por tanto, su nivel de alcohol (ACOSTA Y FERRER, 2013).

En Lanzarote se producen diferentes variedades de vid en un territorio que tiene un clima semidesértico, en el que las precipitaciones, irregulares y ocasionalmente torrenciales, rara vez superan los 150 mm anuales. Además, la evapotranspiración es elevada, entre 700 y 800 mm al año, y las temperaturas medias rondan los 20°C, siendo el mes más frío enero, cuando las temperaturas no bajan de 10°C, y el más cálido agosto,

cuando se sitúan en torno a los 30°C. Cabe destacar la fuerza y persistencia de los vientos alisios procedentes del anticiclón de las Azores (GONZÁLEZ MORALES *et al.*, 2002).

Existen diferentes formas extendidas en Lanzarote para el cultivo de la vid, entre las que destacan la construcción en hoyos, en zanjas, en parrales y en chabocos. Todas las modalidades de cultivo tienen presente al rofe como elemento común, aislando la tierra fértil de la superficie, tanto en zonas donde ya existía el rofe como en enarenados artificiales. La capa de rofe varía en profundidad según la existencia previa, pero nunca es inferior a 30 centímetros, pudiendo alcanzar hasta los 3 metros (ACOSTA y FERRER, 2013). Debido a la constancia con que los vientos del noreste azotan a la Isla, es una práctica común la fabricación zocos, pequeños muros de piedra volcánica de unos 60–70 cm que ocupa aproximadamente la mitad del perímetro del hoyo en la parte expuesta al efecto del viento dominante, que suelen estar presentes en los hoyos o en las zanjas (BOC, 2010). Estos zocos están sujetos por la propia porosidad de las rocas volcánicas, sin ningún tipo de pegado ni sellado, y los huecos existentes entre las rocas permiten la ventilación de la viña (ACOSTA y FERRER, 2013).

En Lanzarote las vides son de pie franco, ya que a Canarias no le afectó la filoxera que arrasó Europa. Las labores agrícolas en la zona de La Geria son siempre de carácter manual. La producción, dependiendo de la técnica de cultivo, oscila entre 1.000 kg y 1.500 kg por hectárea, y se debe a una baja densidad de plantación de 300/900 plantas/ha. La producción total de la isla oscila entre el millón y los tres millones de kilos (D.O. Lanzarote, 2018).

Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) son un grave problema para la sostenibilidad de este cultivo debido a que causan importantes pérdidas de producción y suponen costes económicos añadidos, debido a la necesidad de replantación de las plantas afectadas y/o muertas (GRAMAJE *et al.*, 2018). Los principales motivos por los que en la actualidad se consideran una grave amenaza para el cultivo son: la gran diversidad de enfermedades y hongos pa-

tógenos asociados a las mismas; la presencia de infecciones conjuntas en las plantas y la dificultad de relacionarlas de forma clara con la expresión de los síntomas externos; el conocimiento todavía escaso sobre su epidemiología; y la escasa disponibilidad de estrategias de control eficaces (GRAMAJE *et al.*, 2018).

Los hongos que provocan las EFMV causan síntomas similares, tales como la alteración interna de la madera de la planta por necrosis y/o por producción seca, una reducción del desarrollo y del vigor, presencia de brotaciones raquílicas, ausencia o retraso de la brotación, hojas pequeñas, acortamiento de entrenudos, clorosis y/o marchitez en las hojas, y un decaimiento general que puede acabar con la muerte de la planta (LUQUE, 2014). Además, es frecuente detectar en las vides la presencia de dos o tres, o más especies fúngicas simultáneamente. Esto afecta a la expresión de los síntomas externos en las plantas, que pueden aparecer tiempo después de que las infecciones se hayan producido y ser muy variables, sin encajar de manera clara en los característicos para una enfermedad concreta (ARMENGOL, 2017).

Con estos antecedentes, en este trabajo se realizó un muestreo de vides con síntomas externos característicos de las EFMV en viñedos de la isla de Lanzarote (Canarias), en las que nunca se había estudiado la presencia de hongos de la madera, con el objetivo de detectar e identificar los patógenos fúngicos asociados a estas enfermedades.

Materiales y métodos *Localización de las parcelas y toma de muestras*

Los estudios incluidos en este trabajo se realizaron a partir de 15 muestras de plantas de vid procedentes de diferentes viñedos en la isla de Lanzarote localizados en La Geria, concretamente en el municipio de Yaiza (Lanzarote).

Las muestras fueron recogidas en plantas que presentaban síntomas externos característicos de enfermedades de la madera (*Figura 1*), desde el 14 de mayo al 24 de septiembre de 2018 y se eligieron de diferentes variedades de viña (*Cuadro 1*).

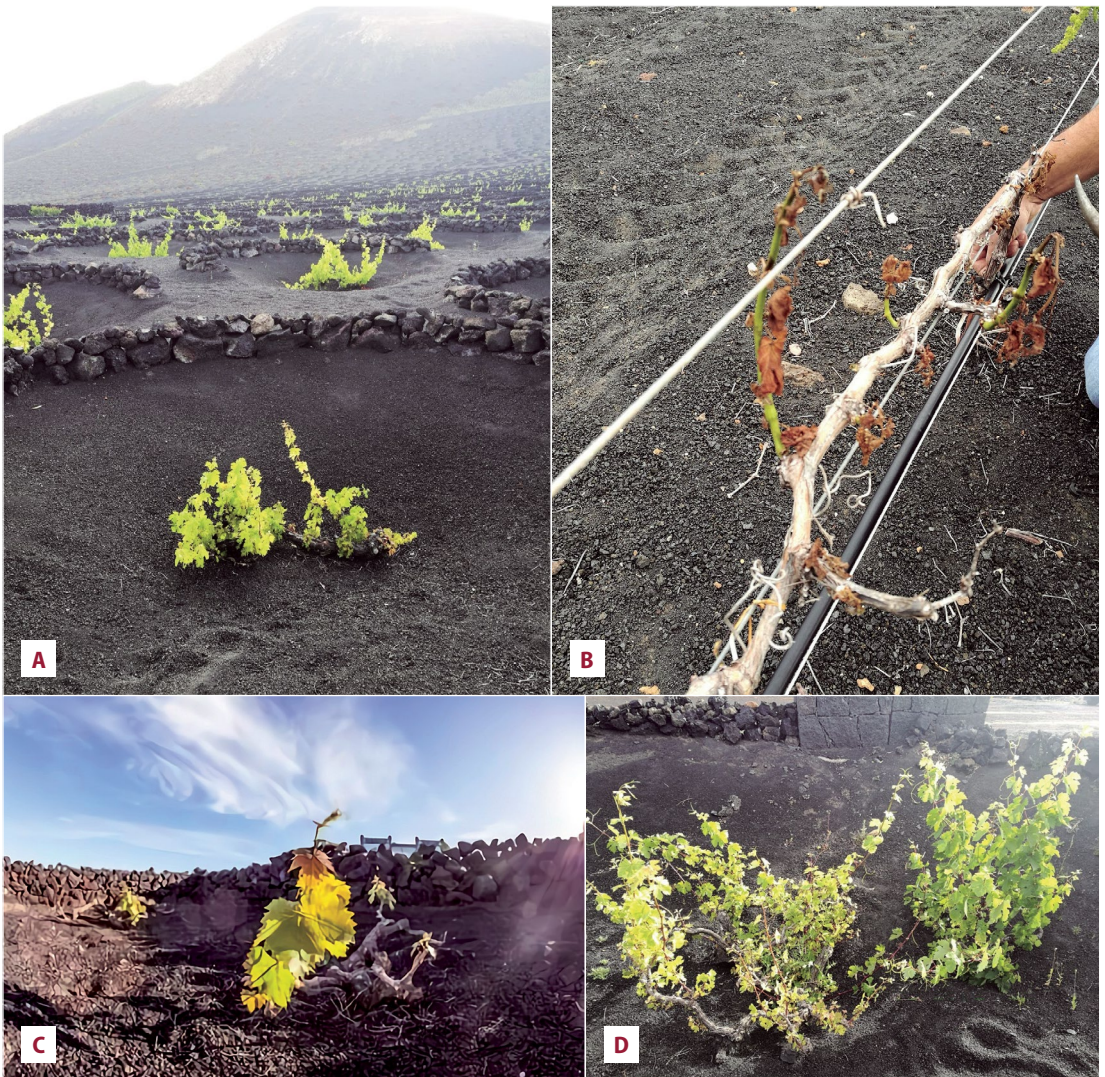


Figura 1. Síntomas observados en algunas de las parcelas de vid estudiadas: **A)** Parra de la variedad 'Malvasía volcánica'. Muchas plantas presentaban sarmientos con hojas amarillas y crecimiento deficiente (Muestra 6). **B)** Rodal de plantas con brotación adecuada, pero que se seca progresivamente (Muestra 3). **C)** Parras 'Moscatel' con brotaciones descompensadas entre unos brazos y otros (Muestra 13). **D)** Parra 'Listán blanco' con hojas cloróticas. A su lado, hay una parra de la misma variedad sana (Muestra 1).

Aislamiento de hongos de medio de cultivo

Se realizaron aislamientos de hongos en medio de cultivo para cada una de las muestras del estudio. Para ello, cada muestra se lavó previamente con agua para eliminar los posibles restos de polvo y/o tierra adheridos a ésta, cortando posteriormente varios fragmentos de madera

de 3 cm de longitud, que en cortes transversales mostraran necrosis internas y/o descomposición esponjosa de la madera (Figura 2). Estos fragmentos se desinfectaron externamente sumergiéndolos durante 3 segundos en alcohol del 70% y posterior flameado.

En cada uno de los fragmentos obtenidos de cada muestra se seleccionaron pequeñas porcio-

Cuadro 1. Especies fúngicas identificadas en cada una de las 15 muestras analizadas.

Muestra nº	Varietal	Hongos detectados
1	Listán blanco	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
2	Petit Verdot	<i>Neofusicoccum parvum</i>
3	Malvasía especial	No se aislaron hongos de la madera
4	Moscatel	<i>Neofusicoccum parvum</i> <i>Phaeoacremonium minimum</i>
5	Malvasía especial	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
6	Malvasía	<i>Neofusicoccum luteum</i>
7	Listán negro	<i>Diplodia seriata</i>
8	Listán negro	<i>Diplodia seriata</i> <i>Phaeoacremonium minimum</i>
9	Listán blanco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
10	Cabernet	<i>Diaporthe ampelina</i>
11	Moscatel	No se aislaron hongos de la madera
12	Listán blanco	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
13	Moscatel	<i>Neofusicoccum luteum</i>
14	Moscatel	<i>Diplodia seriata</i> <i>Neofusicoccum luteum</i> <i>Phaeoacremonium minimum</i> <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
15	Malvasía	<i>Neofusicoccum parvum</i>

nes (2–4 mm) de madera en las que se observa el frente de avance de algún tipo de necrosis y/o descomposición esponjosa. Estas porciones se sembraron en medio de cultivo agar extracto de malta con la adición de sulfato de estreptomina (MEAS) (20 g de extracto de malta; 15 g de agar; 0,5 g de sulfato de estreptomina; 1 litro de agua destilada).

Las placas así sembradas se incubaron en estufa a 25°C en oscuridad durante 14–21 días. De las colonias crecidas se extrajeron puntas hifales en las zonas de borde, que se picaron a medio patata–dextrosa–agar (PDA) (39 g de patata–dextrosa–agar; 1 litro de agua destilada), para su posterior identificación. Las colonias ya repicadas se dejaron a 25°C en oscuridad durante 10–15 días.

Tras la incubación, se procedió a realizar una identificación morfológica tentativa de las co-

Cuadro 2. Región amplificada, cebador utilizado y secuencia para la identificación molecular de los aislados.

Región amplificada	Cebador	Secuencia	Referencia
β -tub	Bt2b	5'ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'	GLASS y DONALDSON, 1995
	T1	5'AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3'	O'DONNELL y CIGELNIK, 1997
tef1	EF1F	5'TGC GGT GGT ATC GAC AAG CGT 3'	JACOBS <i>et al.</i> , 2004
	EF2R	5'AGC ATG TTG TCG CCG TTG AAG 3'	JACOBS <i>et al.</i> , 2004
ITS	ITS1F	5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'	GARDES and BRUNS, 1993
	ITS4	5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	WHITE <i>et al.</i> , 1990

lonias fúngicas crecidas en el medio PDA. Ésta se basaba en observar el aspecto morfológico de las colonias (color, tipo y abundancia de micelio, etc.) y en realizar preparaciones al microscopio para la identificación morfológica de las estructuras específicas de esporulación de los diferentes hongos obtenidos. A partir de esta observación se seleccionaron las colonias fúngicas de los posibles hongos de la madera a partir de las cuales se completó su identificación mediante técnicas moleculares.

Identificación molecular de hongos

La identificación molecular se realizó mediante métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos universales y la secuenciación de determinados fragmentos de ADN.

El DNA genómico de todos los aislados se extrajo con el kit E.Z.N.A.® Plant DNA Miniprep (Omega Bio–tek, U.S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de los cultivos monosporicos y monohifales realizados anteriormente, crecidos en medio PDA a 25°C en oscuridad durante 1 o 2 semanas. Al inicio de la extracción de DNA, el micelio de cada colonia se raspó con un bisturí, se colocó en un microtubo de plástico de 1,5 mL con 4 esferas de metal de 2,38 mm de diámetro y 2 de 3 mm y se rompió mecánica-

mente con la ayuda del equipo FastPrep-24 TM 5G MP Biomedicals.

La amplificación del ADN se realizó mediante PCR. En el caso de las especies pertenecientes al género *Phaeoacremonium* se amplificó una región del gen de la β -tubulina (β -tub2), para las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae se amplificó una parte del gen del factor de elongación 1- α (tefl), y para los aislados pertenecientes a la familia Diatrypaceae y *Pa. chlamydospora* se amplificó la región ITS (Cuadro 2). La reacción de PCR contenía Buffer 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,8 mM de dNTP, 0,4 mM de cada cebador, 1 U/ μ L de hot began Taq ADN polimerasa (Canvax Biotech, Córdoba, España) y 1 μ L de la muestra de ADN. La reacción se ajustó a un volumen final de 20 μ L con agua destilada estéril. Se añadieron un control negativo (agua) y un control positivo (ADN de un aislado identificado como *Pm. minimum*, como *Lasiodiplodia theobromae*, o como *Pa. chlamydospora*). El programa de PCR consistió en un primer paso

de la desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 50 segundos, correspondientes a los pasos de desnaturalización, anillamiento y amplificación respectivamente. Por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El ADN amplificado de los aislados se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, s.l.) siendo análogo al bromuro de etidio. Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron mediante comparación con el marcador de referencia (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder).

Las muestras amplificadas, se secuenciaron y los resultados obtenidos se editaron con el programa Sequencher (versión 5.0). Posteriormente, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias presentes en el GenBank mediante el programa BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos).



Taegro®
Naturalmente protegido

El nuevo biofungicida natural y sostenible para el control preventivo de oídio y botritis en viña y uva de mesa, sin plazo de seguridad ni LMR




Taegro®

syngenta.



© 2020 Syngenta. Todos los derechos reservados. TM y ® son marcas comerciales del Grupo Syngenta.
Use los productos fitosanitarios de manera segura.
Lea siempre la etiqueta y la información sobre el producto antes de usarlo.

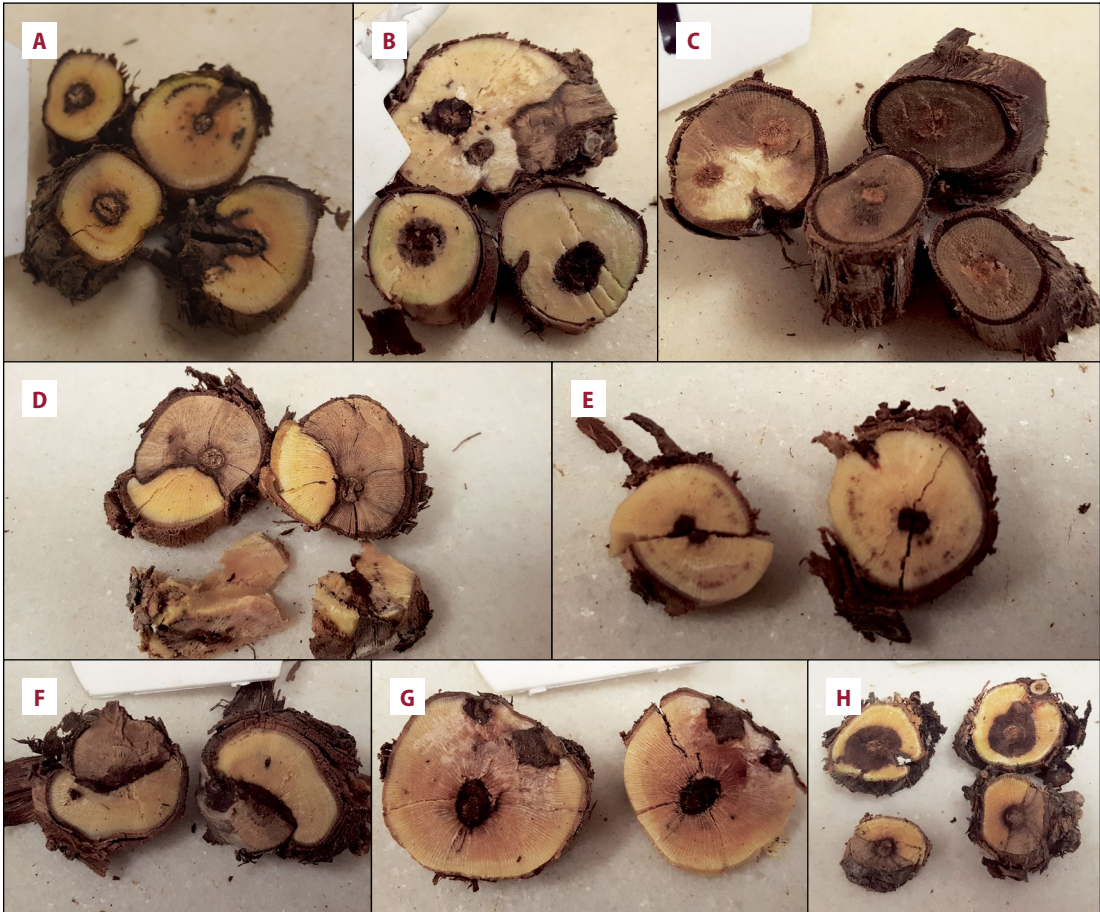


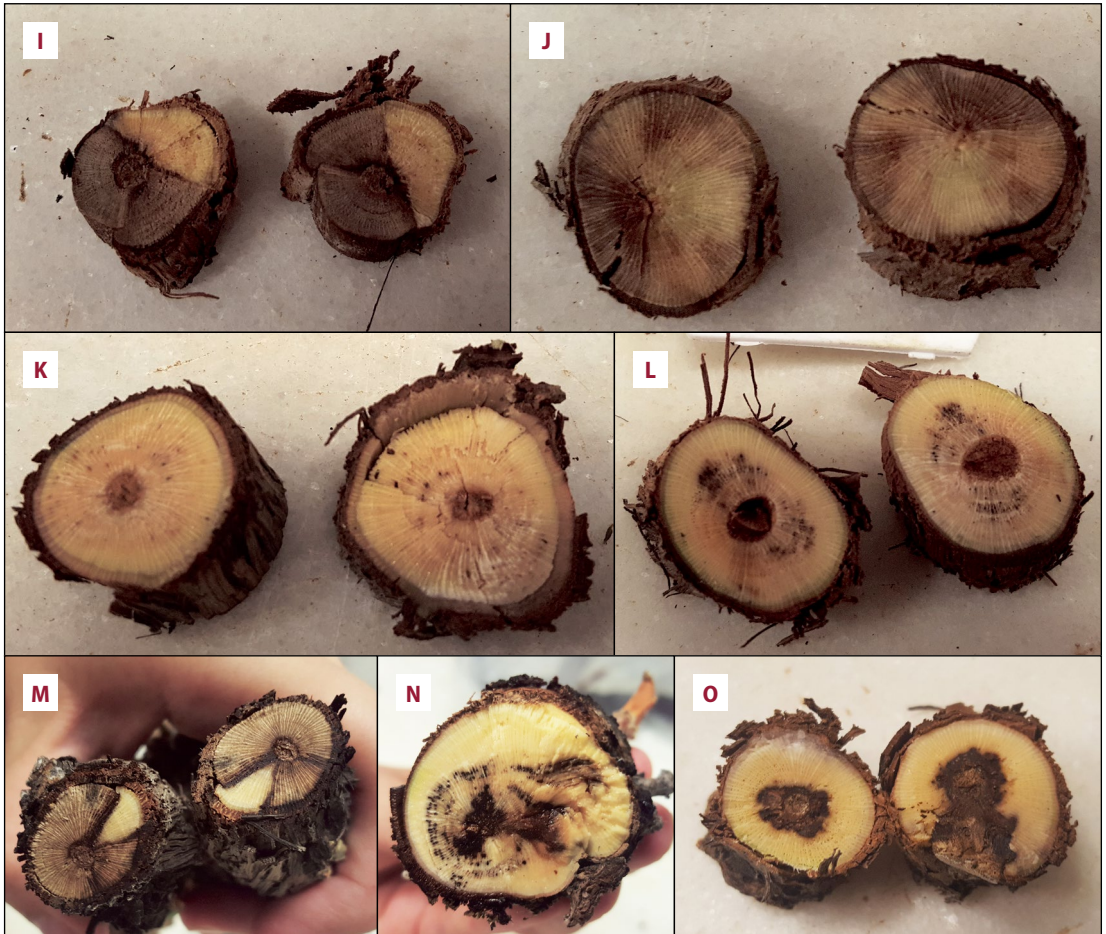
Figura 2. Cortes transversales de las muestras de madera de vid: **A)** Muestra 1 de 'Listán Blanco'. **B)** Muestra 2 de 'Petit Verdot'. **C)** Muestra 3 de 'Malvasía especial'. **D)** Muestra 4 de 'Moscatel'. **E)** Muestra 5 de 'Malvasía especial'. **F)** Muestra 6 de 'Malvasía'. **G)** Muestra 7 de 'Listán negro'. **H)** Muestra 8 de 'Listán negro'. **I)** Muestra 9 de 'Listán blanco'. **J)** Muestra 10 de 'Cabernet'. **K)** Muestra 11 de 'Moscatel'. **L)** Muestra 12 de 'Listán blanco'. **M)** Muestra 13 de 'Moscatel'. **N)** Muestra 14 de 'Moscatel'. **O)** Muestra 15 de 'Malvasía'.

Resultados y discusión

En la *Figura 2* se pueden ver los síntomas internos observados en los cortes transversales de la madera de las muestras incluidas en este estudio, mientras que el *Cuadro 1* se indican los hongos asociados a las EFMV detectados en las muestras analizadas.

La muestra 1 procedía de una parra de la variedad 'Listán blanco' y los análisis indicaron que esta muestra estaba infectada por los hongos *Pm. parasiticum* y *Pa. chlamydospora*. La parra presentaba un crecimiento anormal y las hojas tenían una clorosis muy acentuada (*Figura*

1D). Al realizar cortes transversales en la muestra de madera, se observó la presencia de pequeñas punteaduras necróticas alrededor de la médula y de una pequeña área con podredumbre seca y esponjosa en la madera, que aparece separada por una línea negra de otra zona más exterior (*Figura 2A*). Estos síntomas internos son característicos de la Yesca de la vid, en la que los principales agentes causales son especies del género *Phaeoacremonium* y *Pa. chlamydospora*, junto con basidiomicetos como *Fomitiporia mediterranea* (BERTSCH *et al.*, 2012; ARMENGOL, 2014), aunque este último hongo, u otros basidiomiceto-



tos no se aislaron en los fragmentos de madera estudiados.

La muestra 2 procedía de una parrá de 'Petit Verdot', en la que se determinó la presencia de *Neofusicoccum parvum* (Cuadro 1). La sintomatología externa era propia del decaimiento por *Botryosphaeria*, ya que el brazo del cual se tomó la muestra no tenía una brotación desarrollada como la de los otros brazos (ÚRBEZ-TORRES, 2011), aunque, al realizar cortes transversales en la muestra (Figura 2B) se observó la presencia de un anillo de madera necrótica alrededor de la médula y no una necrosis sectorial que habría sido un síntoma interno más característico del decaimiento por *Botryosphaeria* causado por este hongo (BERTSCH *et al.*, 2012; ÚRBEZ-TORRES, 2011).

La muestra 3 procedía de una parrá de 'Malvasía especial' que presentaba la brotación seca (Figura 1B), además, presentaba unos síntomas internos con necrosis extensas (ocupando todo el corte de la madera) o con bordes irregulares que son característicos de los daños causados por *Diaporthe* spp. en vid (Figura 2C), que es un hongo que penetra desde el exterior hacia el interior de la madera (GUARNACCIA *et al.*, 2018). No obstante, los aislamientos realizados no permitieron detectar ningún hongo fitopatógeno en esta muestra.

La muestra 4 procedía de una parrá de 'Moscatel', en la que se determinó la presencia de *N. parvum* y *Pm. minimum* (Cuadro 1). Esta muestra procedía de una planta que tenía poco crecimiento, la brotación iba más atrasada de lo

normal y algunas hojas presentaban pequeñas deformaciones. Los cortes realizados en la madera (Figura 2D) mostraron una necrosis sectorial de aproximadamente 3/4 partes de la superficie de color marrón oscuro y de consistencia dura. Estos síntomas son característicos del decaimiento por *Botryosphaeria* (ÚRBEZ-TORRES, 2011), encajando con la detección del hongo *N. parvum* que pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*. Además, junto a este hongo, se detectó también la presencia de *Pm. minimum* habitualmente asociado a las enfermedades de Petri y Yesca (BERTSCH, et al., 2012), mostrando la coocurrencia de diversas especies fúngicas en una misma planta, que es una de las características de las EFMV, haciendo que sean consideradas enfermedades complejas (GRAMAJE et al., 2018).

La muestra 5 procedía de una parra de 'Malvasía especial', en la que se detectó la presencia de *Pa. chlamydospora* (Cuadro 1). La parra presentaba una brotación retrasada y, al realizar cortes transversales en la madera, se pudo apreciar la presencia de unas pequeñas punteaduras y el oscurecimiento de la médula (Figura 2E). Tanto los síntomas internos como los externos concordaban con los síntomas característicos de este hongo que provoca esas punteaduras necróticas de los vasos xilemáticos (BERTSCH et al., 2012; GRAMAJE et al., 2018).

La muestra 6 procedía de una parra de 'Malvasía', en la que se determinó la presencia de *N. luteum* (Cuadro 1). Esta parra tenía un brazo con brotación escasa y hojas secas (Figura 1A). Cuando se procedió a realizar el corte transversal de la madera se pudo observar que había una necrosis sectorial de la madera de color oscuro que se separaba de la madera sana con una zona más oscurecida (Figura 2F).

La muestra 7 procedía de una parra de 'Listán negro', en la que se determinó la presencia de *Diplodia seriata* (Cuadro 1), que es una de las especies de la familia *Botryosphaeriaceae* más frecuentemente asociadas al decaimiento por *Botryosphaeria* (ARMENGOL, 2014). Asimismo, la planta presentaba una brotación un poco más lenta que otras parras de la misma variedad en el mismo viñedo. El corte transversal de la madera (Figura 2G) permitió comprobar que esta

tenía la médula oscurecida con algunas zonas.

La muestra 8 procedía de una parra de listán negro, en la que se determinó la presencia de *Da. seriata* y *Pm. minimum* (Cuadro 1). La planta presentaba poco crecimiento y, al realizar cortes transversales en su madera, se encontró que la zona de la médula estaba rodeada por un aro grueso de madera necrótica (Figura 2H). Estos síntomas encajaban con la presencia de varias especies simultáneamente, tal y como determinó el análisis realizado.

La muestra 9 procedía de una parra de 'Listán blanco', en la que se determinó la presencia de *Lasioidiplodia theobromae* (Cuadro 1). La planta presentaba crecimiento escaso y en los cortes transversales de la madera se observó que había una necrosis sectorial de la madera de color oscuro que se separaba de forma marcada de la madera sana (Figura 2I), idénticos a los descritos con anterioridad por ÚRBEZ-TORRES (2011) como característicos del decaimiento por *Botryosphaeria*.

La muestra 10 procedía de una parra de 'Cabernet', en la que se determinó la presencia de *Diaporthe ampelina* (Cuadro 1). La mayoría de las parras de esta variedad mostraban un decaimiento y una brotación atrasada. En la madera, al realizar cortes transversales, se observó una necrosis generalizada (Figura 2J), que parecía penetrar de fuera hacia dentro y que coincidía con los síntomas descritos en diferentes estudios acerca de los daños causados por *De. ampelina* en viña (GRAMAJE et al., 2018; GUARNACCIA et al., 2018).

La muestra 11 procedía de una parra de 'Moscatel' en la que no se aislaron hongos de madera (Cuadro 1), aunque la muestra presentaba punteaduras necróticas de los vasos xilemáticos (Figura 2K), sintomatología que es característica de la enfermedad de Petri (BERTSCH et al., 2012; GRAMAJE et al., 2018).

La muestra 12 procedía de una parra de 'Listán blanco', en la que se determinó la presencia de *Pa. chlamydospora* (Cuadro 1). La planta mostraba una clorosis muy acentuada, y en la muestra de madera se observó la presencia de pequeñas punteaduras necróticas alrededor de la médula (Figura 2L), similar a los síntomas internos de la muestra 5, tanto los síntomas internos como los



externos concordaban con los síntomas característicos de *Pa. chlamydospora* que provoca esas punteaduras necróticas de los vasos xilemáticos (BERTSCH *et al.*, 2012), tal como ocurrió también en la muestra 5.

La muestra 13 procedía de una parra de 'Moscatel', en la que se determinó la presencia de *N. luteum* (Cuadro 1). Muchas de las parras 'Moscatel' del viñedo presentaban brotaciones descompensadas entre unos brazos y otros (Figura 1C). Al realizar cortes transversales en la madera se encontró que existía una necrosis sectorial muy grande, dejando tan solo un pequeño sector con madera (Figura 2M).

La muestra 14 procedía de una parra de 'Moscatel', en la que se determinó la presencia de *Da. seriata*, *N. luteum*, *Pm. minimum* y *Pa. chlamydospora* (Cuadro 1). La parra presentaba una brotación irregular, hojas deformadas y estaba un poco clorótica. El corte transversal de la madera permitió observar que presentaba gran cantidad de punteaduras necróticas y zonas totalmente necrosadas (Figura 2N) combinando así los síntomas propios del decaimiento por *Botryosphaeria* (causada en este caso por *Da. seriata* y *N. luteum*), con los síntomas que provocan *Pm. minimum* y *Pa. chlamydospora* (punteaduras necróticas correspondientes a los vasos xilemáticos alrededor de la médula).

La muestra 15 procedía de una parra de 'Malvasía', en la que se determinó la presencia de *N. parvum* (Cuadro 1). La planta tenía las hojas y los racimos pequeños. En el corte transversal de la madera se podía observar una zona necrótica alrededor de la médula similar a la observada en la muestra 2, y un sector con podredumbre seca, irregular y esponjosa (Figura 2O) que podría ser debida a la presencia de algún hongo basidiomiceto. No obstante, el resultado de los análisis solo permitió detectar la presencia de *N. parvum*.

En conjunto, en las muestras estudiadas se detectaron cuatro especies fúngicas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (*Da. seriata*, *L. theobromae*, *N. parvum* y *N. luteum*), dos especies pertenecientes al género *Phaeoacremonium* (*Pm. minimum* y *Pm. parasiticum*), el hongo *Pa. chlamydospora* y, solo en una de las muestras, la especie *De. ampelina*.

Las especies de Botryosphaeriaceae tienen una distribución cosmopolita, y se encuentran en una amplia gama de hospedadores (ÚRBEZ-TORRES, 2011), encontrándose dentro de esta familia algunas de las principales especies asociadas a EFMV en todo el mundo (GRAMAJE *et al.*, 2018). En este trabajo las diferentes especies de Botryosphaeriaceae se detectaron con la siguiente frecuencia: *Da. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum* fueron las es-

pecies más frecuentes, encontradas en un 20% de las muestras, mientras que *L. theobromae* se encontró solo en un 6,7% de las muestras.

El género *Phaeoacremonium* y la especie *Pa. chlamydospora* están ampliamente extendido por todo el mundo asociados a Yesca y la enfermedad de Petri en vid (GRAMAJE *et al.*, 2015 y 2018). El muestreo realizado en este trabajo, ha permitido confirmar la presencia en Lanzarote de *Pa. chlamydospora*, *Pm. parasiticum* y *Pm. minimum*. *Phaeomonilla chlamydospora* se aisló cuatro de las quince muestras estudiadas (26,67%). La especie más frecuente de *Phaeoacremonium* en el estudio fue *Pm. minimum*, en un 20% de las muestras estudiadas, mientras que *Pm. parasiticum* se detectó solo en una muestra.

Respecto a *Diaporthe* spp., muchos estudios han estudiado la presencia de este género fúngico (como *Phomopsis* spp.) en vid. En un estudio reciente, GUARNACCIA *et al.* (2018) indica que en Europa *De. ampelina* está presente en Croacia, República Checa, Francia, Hungría, Israel, Italia, España y el Reino Unido.

Cabe destacar que el estudio realizado en este trabajo representa la primera evaluación de las EFMV en la isla de Lanzarote. Las especies encontradas en los análisis se citan por primera vez en la isla y, en general, también en las islas Canarias.

Actualmente en Lanzarote, por regla general, apenas se realizan medidas preventivas para evitar la propagación de las EFMV que afectan a las plantaciones de vid ya establecidas en la isla. Habría que procurar realizar las podas con tiempo seco, no provocar heridas grandes y protegerlas con fungicidas o agentes de biocontrol autorizados. Además, en la medida de lo posible, es recomendable desinfectar regularmente los útiles de poda entre plantas. En el caso de encontrar necrosis o podredumbre seca en un brazo, habría que cortar hasta encontrar tejido sano, o rejuvenecer la planta a partir de brotes basales. Asimismo, el material vegetal generado después la poda no se debería abandonar en la parcela, procediendo lo antes posible a su gestión, evitando así que actúe como fuente de inóculo fúngico para posibles infecciones por vía aérea. ●

Bibliografía

- ACOSTA, R. y FERRER, M., (2013). Lanzarote y el vino, paisaje y cultura. Lanzarote. Ediciones Remotas. 109 pp.
- 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.
- BERTSCH, C., RAMIREZ-SUERO, M., MAGNIN-ROBERT, M., LARIGNON, P., CHONG, J., ABOU-MANSOUR, E., SPAGNOLO, A., CLEMENT, C. y FONTAINE, F., (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62: 243–265.
- BOC, (2010). Boletín Oficial de Canarias. Número 191. Cabildo Insular de Lanzarote. Lanzarote: s.n.
- D.O. Lanzarote, (2018). Denominación de Origen de Vinos Lanzarote. <https://dolanzarote.com/> (Consultado el 7 de octubre de 2018).
- GARDES, M. y BRUNS, TD., (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118.
- GLASS, N. L. y DONALDSON, G. C., (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323–1330.
- GONZÁLEZ MORALES, A., RAMÓN OJEDA, A. Á. y HERNÁNDEZ TORRES, S., (2002). El cultivo del viñedo como recurso turístico cultural: El caso de la Geria (Lanzarote. Islas Canarias, España), Lanzarote. Gobierno de Canarias.
- GRAMAJE, D., MOSTERT, L., GROENEWALD, J. Z. y CROUS, P. W., (2015). *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, 119: 759–783.
- GRAMAJE, D., ÚRBEZ-TORRES, J. R. y R. SOSNOWSKI, M., (2018). Managing Grapevine Trunk Diseases with Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease*, 102: 12–39.
- GUARNACCIA, V., GROENEWALD, J.Z., WOODHALL, J., ARMENGOL, J., CINELLI, T., EICHMEIER, A., EZRA, D., FONTAINE, F., GRAMAJE, D., GUTIERREZ-AGUIRREGABIRIA, A., KALITERNA, J., KISS, L., LARIGNON, P., LUQUE, J., MUGNAI, L., NAOR, V., RAPOSO, R., SÁNDOR, E. y VÁCZY, K.Z., (2018). *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia*, 40: 135–153.
- JACOBS, K., BERGDAHL, DR., WINGFIELD, MJ., HALIK, S., SEIFERT, T. KA., BRIGHT, DE. y WINGFIELD, BD., (2004). *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*, 108: 411–418.
- LUQUE, J., ELENA, G., ARMENGOL, J. y LEGORBURU, J. (2014). Las enfermedades de la madera de la vid: Reflexiones sobre un panorama complejo. *Phytoma España*, 260: 18–24.
- O'DONNELL, K. y CIGELNIK, E., (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non orthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 103–116.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R., (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: S5–S45.
- WHITE, TJ., BRUNS, T., LEE, S. y TAYLOR, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocol: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315–322.