



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**Efecto de los tratamientos por termoterapia con  
agua caliente sobre la micoflora presente en plantas  
de vid injertadas.**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN VEGETAL**

Presentado por:

**Jesús Alfonso Crespo**

Director:

**Josep Armengol Fortí**

Valencia, Septiembre 2015



## **Agradecimientos**

A mi director Josep Armengol Fortí por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por su incansable paciencia conmigo y por toda la ayuda brindada durante estos meses.

A todo el departamento de patología vegetal en especial a Maela León por su ayuda durante toda la fase experimental.



## Índice

Introducción .....	1
Justificación y objetivos .....	5
Materiales y métodos .....	7
Resultados .....	11
Discusión .....	23
Conclusiones .....	27
Bibliografía .....	29

## Índice de figuras

**Figura 1:** Porcentaje de puntos de aislamiento con o sin crecimiento fúngico para los diferentes tratamientos: control; 50°C 30 min. y 53°C 30 min. en la zona del injerto (A) y la base del patrón (B). Para cada tratamiento se realizaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta). ..... 13

**Figura 2:** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid (Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Dm: *Dactylonectria macrodidyma*; Ds: *Diplodia seriata*; Il: *Ilyonectria liriodendri*; Np: *Neofusicoccum parvum*; Pf: *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y Pm: *Phaeoacremonium minimum*) y su porcentaje de puntos de infección para la zona de injerto y para los diferentes tratamientos (A) Control; (B) 50°C 30 min. y (C) 53°C 30 min.. Para cada tratamiento se evaluaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta). ..... 20

**Figura 3:** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid (Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Dm: *Dactylonectria macrodidyma*; Ds: *Diplodia seriata*; Il: *Ilyonectria liriodendri*; Np: *Neofusicoccum parvum*; Pf: *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y Pm: *Phaeoacremonium minimum*) y su porcentaje de puntos de infección para la zona de la base del patrón y para los diferentes tratamientos (A) Control; (B) 50°C 30 min. y (C) 53°C 30 min. Para cada tratamiento se evaluaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta). ..... 21

## Índice de tablas

**Tabla 1:** Cebadores utilizados para la identificación molecular..... 9

**Tabla 2** Porcentaje de puntos de aislamiento en la que se detectó la presencia de hongos en puntos diferentes de la zona de injerto/ patrón y para los diferentes tratamientos (control; 50º 30 min. y 53º 30 min.). Para cada tratamiento se evaluaron un total 20 plantas y de 300 puntos de aislamiento (15 puntos de aislamiento/ planta). ..... 14

**Tabla 3** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid y su porcentaje de puntos de infección para las diferentes zonas de la planta (injerto/ base del patrón) y para los diferentes tratamientos (Control; 50ºC 30 min. y 53ºC 30 min.). Para cada tratamiento se evaluaron un total de 20 plantas y 300 puntos de aislamiento (15 puntos de aislamiento/planta). ..... 17

# 1. Introducción

---



## Introducción

En las últimas décadas se viene observando una incidencia creciente en los daños originados por enfermedades fúngicas que afectan a la madera de vid (EFMV) (García-Jiménez *et al.*, 2010). Este aumento es debido a múltiples factores, tales como cambios en las prácticas culturales y el manejo de los viñedos, la prohibición de materias activas fungicidas, siendo la más destacable la prohibición del arsenito sódico, la utilización de fungicidas menos efectivos y la baja calidad sanitaria del material de propagación (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Todo ello origina grandes pérdidas económicas en el sector vinícola tanto en España, como en el resto del mundo.

Las EFMV pueden describirse de forma general como una serie de afecciones que provocan alteraciones internas en la madera, pudiendo provocar la muerte de la zona afectada e incluso, a largo plazo, la muerte de la planta entera (García-Jiménez *et al.*, 2010). Estas enfermedades pueden darse tanto en planta adulta como en planta joven, siendo cada vez más frecuente en los últimos años la presencia de éstas en planta joven, tanto en vivero como en plantaciones comerciales (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Tradicionalmente las EFMV se reducían a la yesca y a la eutipiosis presentándose sobre planta adulta, pero en las últimas décadas se han ampliado a otras como del pie negro, la enfermedad de Petri y el brazo negro muerto, las cuales como ya se ha comentado presentan una incidencia creciente en planta joven (Agustí-Brisach *et al.*, 2014).

La eutipiosis está causada por el ascomiceto *Eutypa lata*. La madera afectada por este patógeno presenta una necrosis sectorial de color marrón oscuro en la sección transversal de la madera. Las plantas enfermas presentan brotaciones débiles y acortamiento de nudos, con hojas pequeñas, deformadas, cloróticas y necrosis marginales (García-Jiménez *et al.*, 2010).

La yesca esta ocasionada por hongos basidiomicetos como *Fomitiporia mediterranea*, pudiéndose encontrar también asociados a esta enfermedad otros hongos como *Phaemoniella chlamydospora* o *Phaeoacremonium minimum* (Bertsch *et al.*, 2012). Esta enfermedad se puede presentar externamente bajo dos formas según su evolución: lenta y rápida o apopléjica. En la evolución lenta, las hojas muestran coloraciones en las zonas internerviales (amarillentas en uva blanca y rojizas en uva tinta) que evolucionan con el tiempo en necrosis. La

producción se ve reducida y los racimos pueden llegar a pasificarse de manera prematura. En la evolución rápida se produce la muerte repentina de la planta. En cuanto a la madera, se produce una podredumbre seca y esponjosa en las zonas centrales del tronco y/o en los brazos, de color amarillento o crema y que aparece separada por una línea negra de otra zona más exterior, de consistencia dura, en la que se aprecian puntos o estrías necróticas (García-Jiménez *et al.*, 2010).

El decaimiento por Botryosphaeriaceae esta originado por varias especies de esta familia, siendo las especies más comunes *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum* (Bertsch *et al.*, 2012). Su sintomatología puede confundirse externamente con la yesca, dado que se presentan necrosis internerviales en las hojas. Interiormente los síntomas son similares a los de la eutipiosis, dado que se presentan necrosis sectoriales de color marrón oscuro y consistencia dura (García-Jiménez *et al.*, 2010).

La enfermedad de Petri tiene como agente causal a hongos del género *Phaeoacremonium*, y las especies *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea* (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Esta enfermedad ocasiona en las plantas retraso del desarrollo y escasa vitalidad, acortamiento de entrenudos, hojas de menor tamaño y cloróticas y, como ultima consecuencia, la muerte de la planta (García-Jiménez *et al.*, 2010). Interiormente, estos hongos colonizan los tejidos xilemáticos. Pueden observarse pequeñas punteaduras o estrías necróticas en la madera correspondientes a los vasos afectados, que pueden verse preferentemente en la parte basal del patrón y que en ocasiones presentan exudaciones gomosas (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

La enfermedad del pie negro está causada por especies pertenecientes a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria* e *Ilyonectria* (Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014). En las plantas afectadas se observa un desarrollo anormal de las raíces, con lesiones oscuras, necróticas y deprimidas, junto con una reducción de la barbada. También se observan coloraciones oscuras en la madera y necrosis, que se inician desde la base. La parte aérea muestra vegetación débil con hojas cloróticas y achaparradas (García-Jiménez *et al.*, 2010).

Los hongos causales de las enfermedades de Petri y del pie negro son habitantes comunes del suelo. Algunas de estas especies producen estructuras de resistencia que les permiten sobrevivir durante largo tiempo en ausencia de hospedantes. En el caso de la yesca, la eutipiosis y el decaimiento por Botryosphaeriaceae, su dispersión se produce por esporas a través del viento y del agua de lluvia. (García-Jiménez y Armengol 2014). Además, los hongos que causan la enfermedad de Petri, junto a los que causan el decaimiento por

## Introducción

Botryosphaeriaceae,, son capaces también de penetrar en las plantas por las heridas de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

Los hongos que causan las EFMV son frecuentes en los campos y afectan tanto a vid como a otros hospedantes. Por otro lado, se tiene constancia, gracias a numerosas investigaciones realizadas en los últimos años, del papel que juega el material vegetal producido en los viveros como vector de propagación y diseminación de estos patógenos (Gramaje y Armengol, 2011).

En todo el mundo se han abordado numerosos estudios para determinar la presencia de EFMV en viveros de vid, puesto que en la producción de plántones en los viveros se incluyen numerosos puntos potenciales de infección en las diferentes fases del proceso de producción de planta injertada como son: la hidratación de las balsas, el desyemado de estaquillas, el injerto, el proceso de inducción al callo basal en las plantas recién injertadas y el enraizamiento de éstas en el campo (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Estos estudios han demostrado que una baja protección sanitaria en el proceso de producción de planta injertada puede tener efectos negativos sobre la calidad de las vides obtenidas (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Por lo tanto, resulta de gran importancia la implantación de prácticas efectivas en el manejo de los viveros, las cuales ayuden a minimizar la infección por estos hongos. Por el momento, no se han conseguido metodologías que consigan erradicar la enfermedad, por tanto los esfuerzos están centrados en mantener niveles bajos de la infección (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Las líneas de investigación actuales optan por la utilización de metodologías de control químico, de control biológico o de termoterapia con agua caliente.

Los tratamientos con agua caliente se presentan como una alternativa con gran potencial para el control de los agentes patógenos dentro de la producción de planta injertada (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). En los estudios realizados en numerosos países se ha observado que la inmersión de barbados en agua caliente a 50°C durante 30 minutos podría ser suficiente para conseguir eliminar los patógenos presentes en el material vegetal. Otros estudios revelan que, dependiendo de la variedad de la vid, es recomendable utilizar unas temperaturas u otras. Por ejemplo la variedad *Pinot noir* resulta más sensible a estos tratamientos que la variedad *Chardonnay* (Bertsch *et al.*, 2012). El uso de unas temperaturas u otras también varía en función del patógeno que tengamos presente en nuestro material vegetal, para eliminar hongos asociados al pie negro de la vid bastan temperaturas alrededor de 50°C, mientras que para eliminar los patógenos causantes de la enfermedad de Petri se necesitan temperaturas entre 51-53°C (Gramaje *et al.*, 2008; 2010). Por otro lado, también pueden darse diferentes tipos de tratamientos, un tratamiento de 54°C durante 5 minutos para

eliminar los patógenos exteriores y otro de 50°C durante 30-45 minutos para controlar los agentes patógenos internos (Bertsch *et al.*, 2012).

En España se ha demostrado que para nuestras condiciones es posible realizar tratamientos de 53°C durante 30 minutos, sin que la viabilidad de la planta se vea afectada, consiguiendo una importante reducción en la presencia de los agentes patógenos causantes de EFMV (Agustí-Brisach *et al.*, 2013

## 2. Justificación y objetivos

---



## Justificación y objetivos

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la aplicación de tratamientos de termoterapia con agua caliente en plantas injertadas de vid sobre la micoflora total interna presente en la madera. Se realizarán dos tratamientos distintos sobre los plantones (50 °C, 30 min. y 53 °C 30 min.) y se cuantificará la supervivencia de la micoflora a ambos tratamientos, comparándola con la de plantas control.

Como objetivo complementario se plantea el estudio específico de la supervivencia o no de hongos patógenos de madera, con lo cual se podrá demostrar la efectividad obtenida por los tratamientos y para los distintos patógenos



### 3. Materiales y métodos

---



## Materiales y métodos

### **3.1. Material Vegetal**

El material vegetal utilizado fueron plantas injertadas enraizadas comerciales de un año; patrón 110 Ritcher y variedad Tintorera. En total se utilizaron sesenta plantas, de las cuales veinte fueron utilizadas como control, otras veinte fueron tratadas a 50°C durante treinta min. y a las veinte restantes se les aplicó un tratamiento a 53°C durante treinta min. con agua caliente.

### **3.2. Tratamiento por termoterapia**

A veinte plantas se les aplicó un tratamiento por termoterapia con agua caliente a 50°C durante 30 min., que es uno de los protocolos de tratamiento recomendados habitualmente para plantas de vid y diferentes patógenos, y otras veinte fueron sometidas a un tratamiento con agua caliente a 53°C durante 30 min. Este último tratamiento es el recomendado por Gramaje et al., (2008) para la eliminación de hongos de madera en material en España, sin afectar a la viabilidad vegetal de plantación.

El tratamiento con agua caliente se llevó a cabo en un “tanque de termoterapia” situado en el invernadero de Patología Vegetal de la E.T.S.I.A.M.N. de la UPV. Se trata de un tanque de planta rectangular de 1000 litros de capacidad que posee resistencias para calentar el agua y agitadores para uniformizar la temperatura. La temperatura se regula mediante sondas térmicas con un termostato de regulación con una sensibilidad de un grado centígrado.

Para el tratamiento con agua caliente, las plantas se introdujeron en bolsas de malla en grupos de 20. Previamente al tratamiento, el material vegetal se sumergió en agua a una temperatura de 25°C durante una hora. Inmediatamente después de finalizar el tratamiento por agua caliente, el material vegetal se sumergió otra vez en agua fría para detener el calentamiento realizado en éste.

### **3.3. Aislamiento de hongos**

Se realizaron aislamientos de hongos con cada una de las 60 plantas del ensayo. Cada planta se lavó con agua para eliminar los restos de tierra adheridos a ésta, cortando posteriormente un fragmento de madera de 3 cm de longitud de la zona de injerto y un fragmento de la zona basal del patrón también de 3 cm de longitud. Los fragmentos se desinfectaron externamente sumergiéndolos durante 3 segundos en alcohol de 96 ° y flameando.

En cada fragmento (zona de injerto o zona basal) se seleccionaron 15 pequeñas porciones (2-4 mm) de madera en las que se observara algún tipo de necrosis. Estas porciones se sembraron en medio de cultivo agar extracto de malta con la adición de sulfato de estreptomicina (MEAS) (20 g de extracto de malta; 15 g de agar; 0,5 g de sulfato de estreptomicina; 1 litro de agua destilada). Las placas de aislamiento se incubaron en estufa a 25°C en oscuridad durante 14-21 días. De las colonias crecidas se extrajeron puntas hifales que se repicaron 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.

### **3.4. Identificación morfológica**

Tras la incubación se procedió a realizar una identificación morfológica tentativa de las colonias 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.

### **3.5. Identificación molecular**

La identificación de las colonias obtenidas se confirmó por identificación molecular, utilizando como primera aproximación la secuenciación de la región ITS (“Internal transcribed spacer”). En aquellos casos donde esta región no era

## Materiales y métodos

concluyente para la identificación, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de algunos genes como el del factor de elongación (EF) para *Botryosphaeriaceae*, el de la beta tubulina (BT) para *Phaeoacremonium* spp y el de la histona 3 (H3) para aislados de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*.

El ADN de los cultivos se extrajo por dos metodologías utilizando micelio fúngico de los cultivos crecidos en PDA durante 2 a 3 semanas a 25 ° C en la oscuridad. En primer lugar se realizó una extracción rápida para la cual se tomó una pequeña cantidad de micelio del hongo y se introdujo en 20µL de NaOH 25 mM, se calentó a 100 °C durante 15 minutos en un termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research Inc., MA, USA). Posteriormente se añadieron 20µL de Tris-HCl 40 mM. El segundo método utilizado fue la extracción por medio del kit E.Z.N.A. (Omega Bio-tek, Doraville, GA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La amplificación de la región ITS y de los fragmentos génicos de EF, BT y H3 se realizó utilizando la combinación de cebadores adecuados (Tabla 1). La mezcla de PCR se preparó con el kit Horse-PowerTaq DNA polymerase (Canvax) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El programa de amplificación seguido fue de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C 30 segundos, Ta (Tabla 1) 30 segundos y 72°C 45 segundos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se conservaron a 4°C hasta su utilización.

**Tabla 1:** Cebadores utilizados para la identificación molecular.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Ta</b>	<b>Región amplificada</b>
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	55	Beta tubulina
T1 (con Bt2b)	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	55	
EF1F	TGCGGTGGTATCGACAAGCGT	55	Factor de elongación
EF2R	AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG		
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55	Region ITS
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55	
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	60	Histona 3
CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG		

El ADN amplificado se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, s.l.) que fluorescía bajo luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación de geles (Gelprinter plus, TDI, Madrid, España).

Los productos de la PCR que contenían una banda única fueron mandados a secuenciar a MacroGen Inc (Amsterdam, Holanda). Las secuencias recibidas se compararon con las secuencias presentes en el GenBank a través del programa BLAST.

## 4. Resultados

---



## Resultados

En la Figura 1, puede observarse el porcentaje de puntos de aislamiento con o sin crecimiento fúngico para los diferentes tratamientos; control, 50°C 30 min. y 53°C 30 min., y zonas de aislamiento: zona de injerto y base de patrón. En la zona del injerto se pudo apreciar una disminución del porcentaje de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico con la aplicación de los tratamientos con agua caliente en comparación con el control sin tratar, pasando de un 73% de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico para las plantas control a un 56% y un 59% de puntos de aislamiento con crecimiento para los tratamientos de 50° 30 min. y 53° 30 min., respectivamente. En cuanto a la base del patrón, en esta zona también se observó el efecto de reducción de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico causado por los tratamientos con agua caliente. Concretamente, se observó un 54% de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico en las plantas control, descendiendo a un 42% de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico para el tratamiento de 50° 30 min. y reduciéndose a un 31% de puntos de aislamiento con crecimiento fúngico en las plantas sometidas al tratamiento de 53°C 30 min..

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de puntos de aislamiento en los que se detectó la presencia de cada uno de los hongos aislados en las diferentes zonas estudiadas (injerto y base del patrón) para los diferentes tratamientos. En esta Tabla los datos están expresados como número de plantas con presencia de cada uno de los hongos o como porcentaje de puntos de aislamiento en los que se aisló cada hongo en los diferentes tratamientos y en las distintas zonas. La identificación de los hongos se realizó mediante técnicas morfológicas y moleculares. En algunos casos la identificación de los aislados se pudo completar a nivel de especie, pero en otros sólo se pudo llegar a una identificación a nivel de género. Asimismo, hubo un caso de un aislado que no se pudo identificar, indicándose éste como “desconocido”.

La micoflora presente en el estudio, constó de un total de cuarenta y tres especies o géneros fúngicos aislados, de los cuales treinta y uno se aislaron de las

plantas sin tratamiento (dieciocho en la zona del injerto y veintiuno en la base del patrón). En las plantas sometidas al tratamiento de 50°C durante 30 min. se aislaron veintisiete especies o géneros fúngicos, siendo nueve de éstos distintos a los aislados en las plantas sin tratar (diecisiete de los cuales se aislaron en la zona del injerto y diecinueve en la base del patrón). Por último en las plantas con tratamiento de agua caliente a 53°C durante 30 min. se aislaron veintitrés especies o géneros fúngicos, tres de los cuales no se habían aislado ni en las plantas control ni en las plantas tratadas a 50°C y otros tres que se habían aislado en las plantas control pero que no aparecieron en las tratadas a 50°C (siendo trece aislados en la zona del injerto y dieciseis en la base del patrón).

En general, se observó una reducción del número de plantas con presencia de hongos y del porcentaje puntos de aislamiento con crecimiento fúngico tras aplicar los tratamientos con agua caliente. Así, por ejemplo, se pasó de cinco plantas con presencia del hongo *Clonostachys rosea* y un 8% de puntos de aislamiento con crecimiento de este hongo en las plantas control en la zona del injerto, a tres plantas con presencia de esta especie con un 2,7% de puntos de aislamiento con crecimiento del hongo para el tratamiento de 50° 30 min. y, finalmente, se obtuvo una única planta con presencia de este hongo con un 0,3% de puntos de para el tratamiento de 53° 30 min. En algunas ocasiones pudo apreciarse el efecto contrario, como por ejemplo con *Fusarium* sp., que pasó de siete plantas con presencia del hongo, con un 16,3% de puntos de aislamiento con crecimiento de éste para las plantas control en la zona del injerto; a nueve plantas con presencia del hongo y un 13,7% de puntos de aislamiento con crecimiento para el tratamiento de 50° 30 min. y a catorce plantas con presencia de *Fusarium* sp., con un 27,7% de puntos de aislamiento con crecimiento para el tratamiento de 53°C 30 min.

## Resultados



**Figura 1:** Porcentaje de puntos de aislamiento con o sin crecimiento fúngico para los diferentes tratamientos: control; 50°C 30 min. y 53°C 30 min. en la zona del injerto (A) y la base del patrón (B). Para cada tratamiento se realizaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta).

**Tabla 2** Porcentaje de puntos de aislamiento en la que se detectó la presencia de hongos en puntos diferentes de la zona de injerto/ patrón y para los diferentes tratamientos (control; 50° 30 min. y 53° 30 min.). Para cada tratamiento se evaluaron un total 20 plantas y de 300 puntos de aislamiento (15 puntos de aislamiento/ planta).

Especies fúngicas	Control				50°C 30 min.				53°C 30 min.			
	Injerto		Patrón		Injerto		Patrón		Injerto		Patrón	
	nº Plantas	% infección										
<i>Acremonium</i> sp.	5	4,3	4	2,3	7	12,3	10	6,3	7	9,7	4	1,7
<i>Acrocalymna</i> sp.	-	-	1	0,3	-	-	1	0,3	-	-	1	0,3
<i>Acrocalymna vagum</i>	-	-	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	1	2,7	-	-	1	0,7	2	0,7	-	-	-	-
<i>Ascomycota</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	0,3	-	-	-	-
<i>Aspergillus amstelodami</i>	-	-	1	0,3	-	-	5	2,7	-	-	2	1,0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	1	0,3	2	0,7	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus ruber</i>	1	0,3	-	-	-	-	1	0,3	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	0,3	2	1,3	1	0,3
<i>Athelia bombacina</i>	2	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,3
<i>Bionectria ochroleuca</i>	2	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bionectria</i> sp.	-	-	-	-	2	0,7	-	-	-	-	-	-
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	4	4,7	3	3,0	2	0,7	1	0,3	6	6,3	2	1,0

**Tabla 2:** Continuación

<i>Cephalotrichum microsporum</i>	1	1,0	-	-	1	1,0	-	-	-	-	-	-
<i>Cercospora sophorae</i>	-	-	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,3	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-	1	0,3	1	0,7	1	0,3	-	-
<i>Clonostachys rosea</i>	5	8,0	6	5,0	3	2,7	3	1,0	1	0,3	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	-	-	3	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Desconocido	1	0,3	7	4,0	2	0,7	1	1,0	-	-	-	-
<i>Diaporthe neotheicola</i>	2	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodia seriata</i>	7	9,3	1	2,7	-	-	-	-	1	0,3	-	-
<i>Eurotium</i> sp.	-	-	-	-	1	0,3	-	-	-	-	1	0,3
<i>Fusarium</i> spp.	7	16,3	11	10,7	9	13,7	15	13,3	14	27,7	14	14,3
<i>Geomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,7
<i>Humicola</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	0,3	-	-	1	0,3
<i>Ilyonectria liriiodendri</i>	-	-	3	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lophiostoma</i> sp.	2	2,3	1	0,3	-	-	5	3,0	1	2,0	-	-
<i>Mucor racemosus</i>	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucoral</i> sp.	-	-	2	1,0	6	4,7	3	1,0	3	1,7	2	0,7
<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	-	-	-	2	1,7	-	-	-	-	-	-
<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	-	-	1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paracremonium inflatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,3



**Tabla 3** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid y su porcentaje de puntos de infección para las diferentes zonas de la planta (injerto/ base del patrón) y para los diferentes tratamientos (Control; 50°C 30 min. y 53°C 30 min.). Para cada tratamiento se evaluaron un total de 20 plantas y 300 puntos de aislamiento (15 puntos de aislamiento/planta).

Especies fúngicas	Control				50°C 30 min.				53°C 30 min.			
	Injerto		Patrón		Injerto		Patrón		Injerto		Patrón	
	nº Plantas	% infección										
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	4	4,7	3	3,0	2	0,7	1	0,3	6	6,3	2	1,0
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	-	-	3	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodia seriata</i>	7	9,3	1	2,7	-	-	-	-	1	0,3	-	-
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	-	-	3	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	-	-	-	2	1,7	-	-	-	-	-	-
<i>Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum</i>	2	3,3	-	-	1	0,7	-	-	1	4,3	-	-
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	3	5,3	9	10,0	4	11,7	2	4,3	1	1,3	1	0,7

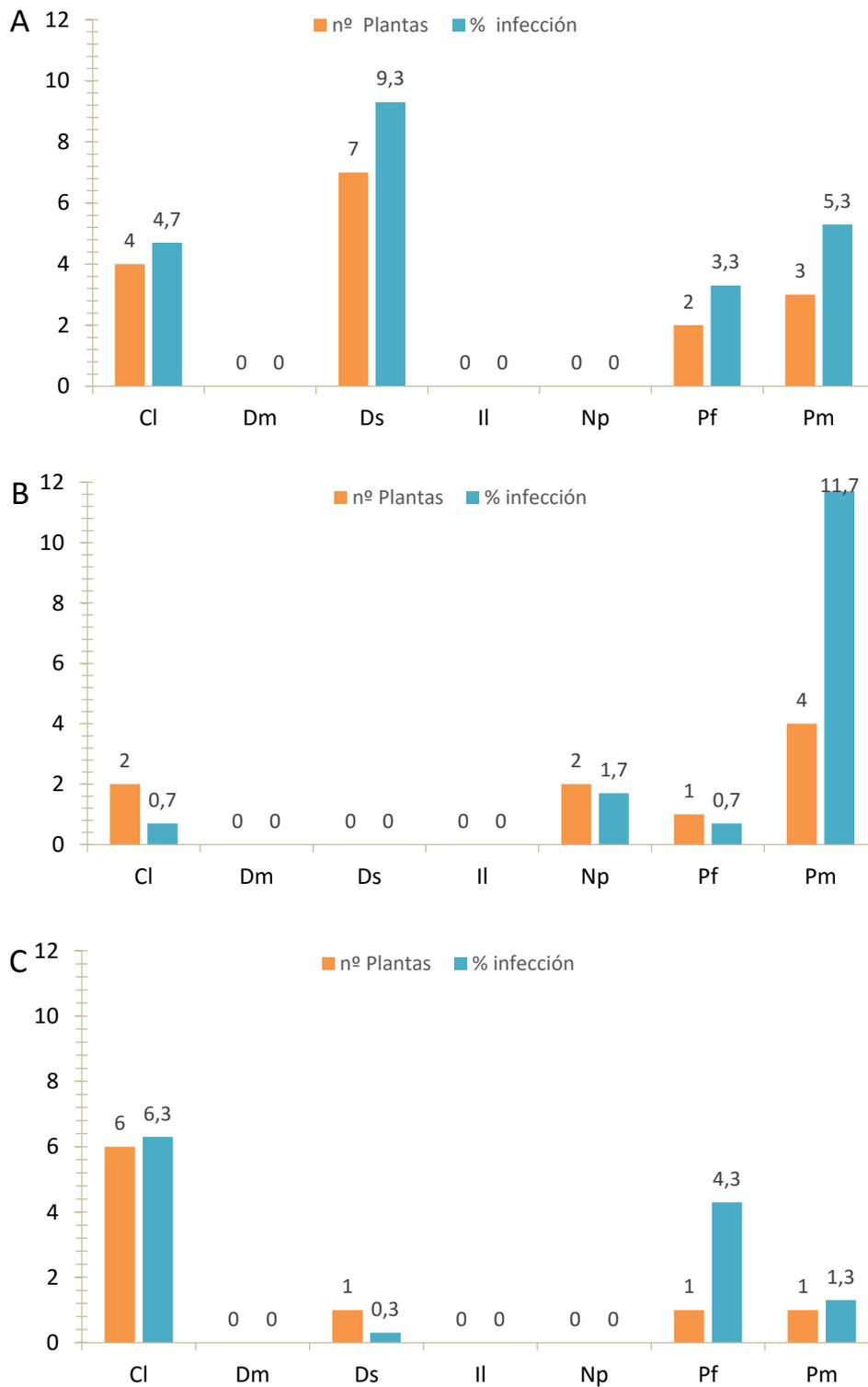
En cuanto a los hongos patógenos de la madera de la vid, para una mejor comprensión de los resultados se elaboró la Tabla 3, que contiene la misma información que la Tabla 2, pero referida solamente a las especies detectadas en el estudio de aislamiento e identificación que son consideradas como patógenos de la madera de la vid: *Cadophora luteo-olivacea*, *Dactylonectria macrodidyma*, *Diplodia seriata*, *Ilyonectria liriodendri*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y *Phaeoacremonium minimum*. La Tabla 3 refleja el número de plantas en las que se detectó cada una de estas especies y el porcentaje de puntos de aislamiento con su crecimiento, todo ello para las diferentes zonas de la planta (injerto y base del patrón) y para los diferentes tratamientos aplicados. Con los datos de esta Tabla se han elaborado también las Figuras 2 y 3.

A continuación se comentan los resultados para la zona del injerto (Tabla 3 y Figura 2). La especie *C. luteo-olivacea* se aisló en 4 plantas (4,7% de puntos de aislamiento con crecimiento) en las plantas control. En el tratamiento de 50°C 30 min. se detectaron 2 plantas infectadas (0,7% de puntos de aislamiento con crecimiento), mientras que el número de plantas infectadas aumento a 6 (6,3% de puntos de aislamiento con crecimiento) en el tratamiento de 53°C 30 min. En la zona del injerto no se encontraron plantas con presencia de *D. macrodidyma* e *I. liriodendri* ni en las plantas control ni para ninguno de los tratamientos con agua caliente. La especie *D. seriata* se aisló en 7 plantas control (9,3% de puntos de aislamiento con crecimiento), no se detectó este hongo en las plantas tratadas a 50°C 30 min., mientras que para el tratamiento de 53°C 30 min. se detectó una única planta infectada (0,3% de puntos de aislamiento con crecimiento). La especie *N. parvum* no se detectó en las plantas control pero si se detectó en dos plantas tratadas a 50°C 30 min. (1,7% de puntos de aislamiento con crecimiento), no aislándose tampoco en el tratamiento a 53°C 30 min. *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* se aisló en la zona del injerto de las plantas control en dos plantas (3,3% de puntos de aislamiento con crecimiento), en las plantas tratadas a 50°C 30 min. se aisló en una sola planta (0,7% de puntos de aislamiento con crecimiento) y en las plantas tratadas a 53°C 30 min. se detectó también sólo en una planta (4,3% de puntos de aislamiento con crecimiento). Finalmente, se encontraron 3

## Resultados

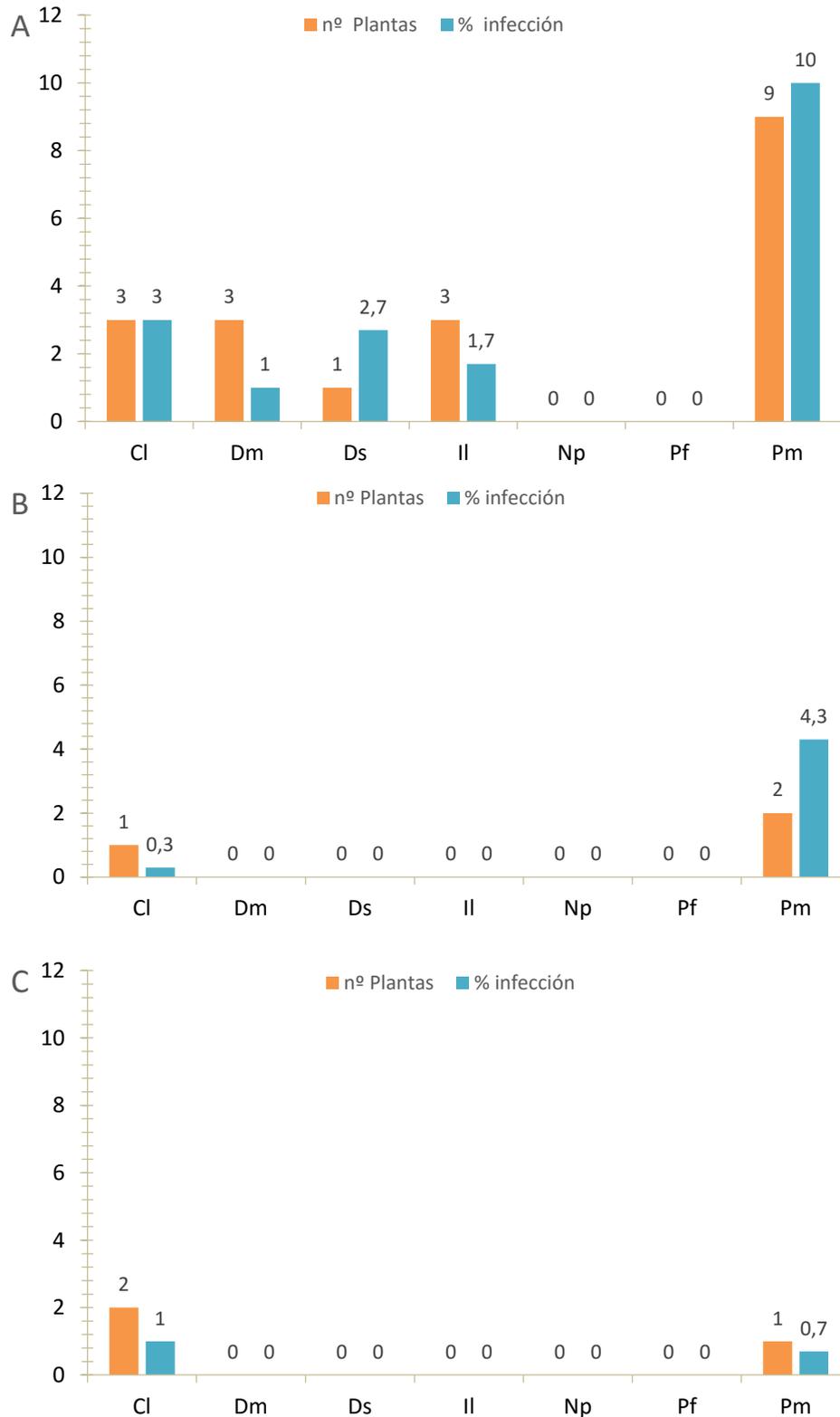
plantas control con presencia de *Pm. minimum* (5,3% de puntos de aislamiento con crecimiento), aumentando a 4 plantas (1,7% de puntos de aislamiento con crecimiento) para el tratamiento a 50°C 30 min., mientras que en el tratamiento a 53°C 30 min. se detectó una sola planta infectada con este hongo (1,3% de puntos de aislamiento con crecimiento).

Seguidamente se exponen los resultados para la zona de la base del patrón (Tabla 3 y Figura 3). La especie *C. luteo-olivacea* se detectó en tres plantas control (3% de puntos de aislamiento con crecimiento), en el tratamiento de 50°C 30 min. se encontró en una sola planta (0,3% de puntos de aislamiento con crecimiento), mientras que aumento a dos plantas (1% de puntos de aislamiento con crecimiento) en el tratamiento de 53°C 30 min. La especie *D. macrodidyma* se aisló en la zona de la base del patrón en tres plantas (1% de puntos de aislamiento con crecimiento) en plantas control, no se observó crecimiento en las plantas tratadas con agua caliente. La especie *D. seriata* se detectó en la zona de la base del patrón en una planta control (2,7% de puntos de aislamiento con crecimiento), no se detectó crecimiento en las plantas tratadas con termoterapia. La especie *I. liriodendri* se detectó en tres plantas control (1,7% de puntos de aislamiento), no detectándose en las plantas a las que se les había aplicado algún tratamiento. *N. parvum* y *Pm. fraxinopennsylvanicum* no se detectaron en la base del patrón de ninguna planta. *Phaeoacremonium minimum* se detectó en nueve plantas control (10% de puntos de aislamiento con crecimiento), disminuyendo a dos plantas en las tratadas a 50°C 30 min. (4,3% de puntos de aislamiento con crecimiento). Con el tratamiento a 53°C 30 min. se obtuvo una sola planta (0,7% de puntos de aislamiento con crecimiento).



**FIGURA 2:** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid (Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Dm: *Dactylonectria macrodidyma*; Ds: *Diplodia seriata*; Il: *Ilyonectria liriodendri*; Np: *Neofusicoccum parvum*; Pf: *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y Pm: *Phaeoacremonium minimum*) y su porcentaje de puntos de infección para la zona de injerto y para los diferentes tratamientos (A) Control; (B) 50°C 30 min. y (C) 53°C 30 min.. Para cada tratamiento se evaluaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta).

## Resultados



**Figura 3:** Número de plantas en las que se detectaron cada uno de los hongos de la madera de la vid (Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Dm: *Dactylonectria macrodidyma*; Ds: *Diplodia seriata*; Il: *Ilyonectria liriodendri*; Np: *Neofusicoccum parvum*; Pf: *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y Pm: *Phaeoacremonium minimum*) y su porcentaje de puntos de infección para la zona de la base del patrón y para los diferentes tratamientos (A) Control; (B) 50°C 30 min. y (C) 53°C 30 min. Para cada tratamiento se evaluaron un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas, 15 puntos de aislamiento/planta).



## 5. Discusión

---



## Discusión

En este trabajo se ha abordado por primera vez el estudio del comportamiento de la micoflora total presente en plantas injertadas de vid procedentes de vivero, tras la aplicación de tratamientos por termoterapia con agua caliente.

Como se muestra en los resultados, la cantidad de hongos aislados (puntos de aislamiento positivos para el crecimiento fúngico) en las plantas tratadas sufrió un descenso con respecto a la cantidad de hongos aislados en las plantas control, tanto en la zona del injerto como en la base del patrón. Este descenso se observó también en los tratamientos con agua caliente en cuanto a la diversidad de la micoflora (número de especies encontradas). No obstante, cuando se observó el comportamiento de las especies aisladas de forma individual, se pudo observar que para algunas de ellas el porcentaje de aislamiento descendió con los tratamientos con agua caliente, pero para otras el comportamiento fue inverso, aumentando su presencia tras los tratamientos por termoterapia. Este hecho, pondría en evidencia la presencia de especies sensibles a las altas temperaturas y otras más termófilas, que presentarían una mejor tolerancia a los tratamientos con temperaturas altas.

Si nos centramos en los hongos patógenos de la madera de la vid, se pueden apreciar distintos comportamientos para las distintas especies detectadas. La especie *Ca. luteo-olivacea* se encontró en las plantas control tanto en la zona del injerto como en la zona del patrón. Tras la aplicación del tratamiento con agua caliente a 50°C 30 min. se consiguió un descenso en el aislamiento de este hongo tanto en la zona del injerto como en el patrón. Sin embargo en las plantas tratadas a 53°C 30 min. aumentó el número de plantas infectadas en la zona del injerto respecto al control, mientras que en la zona de la base del patrón la infección fue menor. Esta especie se mostró muy resistente a los tratamientos con agua caliente, incluso a temperaturas de 53°C, resultados que coinciden con lo indicado por Gramaje *et al.* (2010), que indicaron que, en experimentos *in vitro* *C. luteo-olivacea* podía tolerar tratamientos con agua caliente de hasta 54°C.

En cuanto a la especie *Dactylonectria macrodidyma*, ésta sólo se aisló en la zona de la base del patrón, resultado esperable dado que *D. macrodidyma* es un hongo del suelo asociado a la enfermedad del pie negro de la vid (Gramaje y Armengol 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014) que sólo afecta a las raíces y la base del patrón. Este hongo no se aisló en las plantas tratadas, por tanto el tratamiento con agua caliente resultó efectivo para el control de este hongo, confirmando los resultados del estudio de (Gramaje *et al.* (2010) que demostraron que *D. macrodidyma* es una especie muy sensible a los tratamientos por termoterapia con agua caliente, perdiendo su viabilidad a partir de 49°C. Un comportamiento similar se observó para *I. lirioidendri* que sólo se detectó en la zona de la base del patrón y no se encontró tras los tratamientos con agua caliente. Este hongo también es un hongo del suelo asociado a la enfermedad del pie negro de la vid (Gramaje y Armengol 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014). Lo cual confirmó los resultados obtenidos en el estudio de Gramaje *et al.* (2010) en el que *I. lirioidendri* tras aplicarle tratamientos con agua caliente a 48°C no era capaz de sobrevivir.

La especie *Diplodia seriata* se aisló en las plantas control tanto en la zona del injerto como en la zona de la base del patrón. Esta especie no se detectó tras la aplicación del tratamiento por termoterapia con agua caliente a 50°C 30 min., pero sí se aisló en la zona del injerto de las plantas tratadas a 53°C 30 min. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Luque *et al.*, (2014) en los cuales la especie *D. seriata* no presentó infección tras la aplicación de un tratamiento con agua caliente entre 50 y 51°C. En cuanto *N. parvum*, hongo perteneciente como el anterior a la familia Botryosphaeriaceae (Bertsch *et al.*, 2012), éste sólo se detectó en la zona del injerto de las plantas tratadas con agua caliente a 50°C 30 min., mientras que no se aisló tras el tratamiento con agua caliente a 53°C 30 min.. Estos resultados coinciden con los del realizado por Billones-Baaijens *et al.*, (2014) en material de propagación de plantas de vid en el cual esta misma especie sobrevivió a tratamientos con agua caliente a 50°C 30 min., mientras que no se obtuvieron aislamientos para tratamientos con agua caliente a temperaturas superiores. En el estudio de Luque *et al.*, (2014) también se obtuvieron resultados similares para *N. parvum*, resultando una especie sensible a los tratamientos de agua caliente a 50-53°C 30 min.

## Discusión

*Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* se aisló sólo en la zona de injerto, detectándose en las plantas control, en las plantas tratadas a 50°C 30 min. y en las plantas tratadas a 53°C 30 min. Resultados similares ya fueron obtenidos en el estudio de Gramaje *et al*, (2010), en el que los tratamientos aplicados entre 50-54°C no fueron suficientes para la eliminación de *Pm. fraxinopennsylvanicum*, especie que llegó a soportar tratamientos con agua caliente de hasta 53°C 30 min., siendo necesario aumentar la temperatura hasta los 55°C para su completa eliminación.

Finalmente la especie *Phaeoacremonium minimum*. apareció en todas las zonas de aislamiento tanto en las plantas control como en las plantas a las que se les aplicó alguno de los tratamientos. Esto ya se observó en el estudio realizado por Gramaje *et al*, (2008) en el cual se obtuvieron, de diferentes puntos geográficos, aislados de hongos de madera a los que se les sometió a tratamientos de agua caliente a distintas temperaturas. De este estudio se mostró que los aislados de *Pm. minimum* que habían sido tratadas a 50- 53°C mostraban viabilidad mientras que los tratados a 54°C no mostraron supervivencia.

En general, los tratamientos por termoterapia con agua caliente aplicados a las plantas de vid injertadas fueron útiles para una reducción de los hongos que afectan a la madera de la vid, pero éstos no se eliminaron completamente. Esto enfatiza la necesidad de complementar los tratamientos con agua caliente con otros métodos de control dentro de proceso de producción de planta injertada en vivero. Además, se ha comprobado que la termoterapia tampoco elimina por completo la micoflora presente en las plantas de vid. Este resultado contradice el argumento utilizado por algunos viverista en contra de estos tratamientos, en el sentido de que los tratamientos por termoterapia con agua caliente podrían ser perjudiciales para las plantas, ya que éstas se llevarían a los viñedos definitivos en condiciones cercanas a la esterilidad y podrían ser colonizadas rápidamente por hongos perjudiciales, afectando negativamente a su viabilidad en campo.



## 6 Conclusiones

---



## Conclusiones

- La cantidad total de hongos aislados (puntos de aislamiento positivos para el crecimiento fúngico) presentes en las plantas de vid injertadas (variedad Tintorera y patrón 110 Ritcher) disminuyó tras la aplicación de tratamientos de termoterapia con agua caliente, disminuyendo también la diversidad de la micoflora (número de especies encontradas). Este estudio muestra la presencia en las plantas injertadas de especies fúngicas sensibles a las altas temperaturas y otras más tolerantes.
- En cuanto a los hongos patógenos de la madera de la vid, se pudieron observar distintos comportamientos. Las especies *D. macrodidyma*, *I. liriodendri* y *N. parvum* fueron controladas con los tratamientos por termoterapia con agua caliente, mientras que las especies *D. seriata*, *Pm. fraxinipennsylvanicum* y *Pm. minimum* sobrevivieron tras estos tratamientos, aunque, en general su incidencia fue menor que en las plantas control. La especie *C. luteo-olivacea* se mostró como muy tolerante a los tratamientos con agua caliente.



## 7 Bibliografía

---



## Bibliografía

- Agustí-Brisach C., Gramaje G., Armengol J. y García-Jiménez J. (2013). Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. *Tierras* 202: 108-113.
- Agustí-Brisach C., García-Jiménez J., Armengol J. y Gramaje G. (2014). Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control. *Phytoma España* 260 Junio-Julio 2014: 26-30
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C. y Fontaine F. (2012). Grapevine trunk disease: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62: 243-265.
- Billones-Baaijens R., Allard A., Hong Y., Jones E.E., Ridgway H.J. y Jaspers M.V. Management of *Botryosphaeria* species infection in grapevine propagation material. Program and abstracts 9<sup>th</sup> International Workshop on Grape vine Trunk Diseases, Adelaide, Australia: 55.
- Gramaje D, Muñoz R.M, Lerma M.L, García-Jiménez J y Armengol J. (2009). Fungal grapevine trunk pathogens associated with Syrah decline in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*. (2009) 48: 396–402
- Gramaje D. y Armengol J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040-1055.
- García-Jiménez J, Raposo R, Armengol J. (2010). Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Pgs.161-173 en: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí, Eds. Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado. SEF-Phytoma-España. Valencia.
- Gramaje D., García-Jiménez J. y Armengol J. (2008). Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. *Annals of Applied Biology* (2008) 95-103.

- Gramaje D., Alaniz S., Abad-Campos P., García-Jiménez J. y Armengol J. (2010). Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology* (2010) 231-241
- Luque J., Georgina E., Armengol J. y Legorburu J. (2014). Las enfermedades de la madera de la vid: reflexiones sobre un panorama complejo. *Phytoma España* 260 Junio-Julio 2014: 18-24.
- Luque J., Elena G., Di Bella V. y Armengol J. (2014) Survival of Botryosphaeriaceae species after hot water treatment. Program and abstracts 9<sup>th</sup> International Workshop on Grape vine Trunk Diseases, Adelaide, Australia: 56.
- Lombard L, Van Der Merwe N.A, Groenewald J.Z y Crous P. W. (2014). Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* (2014) 53, 3.
- MAGRAMA (2014). Guía de gestión integrada de plagas. Uva de transformación. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 160-163.