



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Departamento de Ecosistemas Agroforestales

Tesis Doctoral

---

Etiología y control de las enfermedades  
fúngicas de la madera del almendro en la isla  
de Mallorca

---

Presentada por:

Diego Olmo García

Dirigida por:

Dr. Josep Armengol Fortí

Dr. David Gramaje Pérez

Valencia, Enero de 2016



Dr. Josep Armengol Fortí, Catedrático del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universidad Politécnica de Valencia y Dr. David Gramaje Pérez, investigador del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino de La Rioja.

**CERTIFICAN:** que la memoria titulada “Etiología y control de las enfermedades fúngicas de la madera del almendro en la isla de Mallorca” para optar al Título oficial de Doctor dentro del programa de Producción Vegetal y Ecosistemas Agroforestales de la Universidad Politécnica de Valencia, presentada por D. Diego Olmo García, bajo nuestra dirección, cumple las condiciones para ser presentada como Tesis Doctoral.

Valencia,

Fdo. Dr. Josep Armengol Fortí

Fdo. Dr. David Gramaje Pérez



*A mis padres y hermanos.*

*A María y Diego.*



La Tesis Doctoral que aquí se presenta ha sido realizada en la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca del Govern Balear y en colaboración con la Universitat Politècnica de València, gracias al apoyo y colaboración de numerosas personas a las que con estas líneas quiero manifestar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, Dr. Josep Armengol y Dr. David Gramaje, por depositar su confianza en mí, por su dedicación, disponibilidad absoluta, enorme ayuda y colaboración continua durante la investigación y la redacción del documento que aquí se presenta. Por entender y aplicar el mejor criterio en la búsqueda de soluciones a los problemas que surgían en el día a día de una Tesis que se realizaba a distancia, y por enseñarme con el ejemplo a trabajar casi sin descanso, pero con la mayor ilusión posible en la labor investigadora, gracias.

Al Dr. José García-Jímenez que en el mismo sentido me apoyó y con sabios consejos me codirigió en los inicios.

A Alicia Nieto, compañera en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, que ha compartido conmigo muchas más tareas del laboratorio de las que le podía pedir, siempre con buena predisposición y buen humor.

A Andreu Juan y Xavier Nadal, Jefes de Servicio de Agricultura, y a Noemí Vila y Marga Rubí, gerentes de la empresa pública SEMILLA, durante la realización de esta Tesis, por entender la necesidad de que esta investigación se llevara a cabo y permitirme con todo el apoyo posible, además de favoreciendo la financiación, que tuviera todo lo necesario para la realización de la misma.

A Bernat Canyellas, compañero en Conselleria, por su ayuda y esfuerzo con la plantación y mantenimiento de la parcela de almendros en las instalaciones de la Conselleria y por transmitirme su enorme conocimiento acerca de este cultivo en Mallorca. En el mismo sentido, quiero agradecer a Toni Martorell, Joan Rallo, Joan Pons y Joan Crespí, que siempre resolvieron mis dudas sobre el almendro. Su sabiduría sobre el almendro me ha permitido conocer y amar más aún a este cultivo.

A Maela León por su ayuda con estudios moleculares en la UPV y por estar siempre dispuesta a explicarme los protocolos relacionados con ellos.

A los alumnos que haciendo sus prácticas o sus trabajos finales de grado me ayudaron en las partes más laboriosas y tediosas de los ensayos de patogenicidad y control realizados en Mallorca: Esteban Perches (IES Felanitx) Pep Mora (UIB) y Kyrian Moses Fabricius (UIB); así como en los ensayos realizados en la UPV: Víctor Serra (UPV). Agradezco también a Valentin Garrigues (UPV) y Antonio Ramón (UPV), por ayudarnos en el mantenimiento de los almendros y ensayos en la UPV.

A todos los *pageses* que sin excepción accedían de buen grado a que prospectáramos sus fincas, muy especialmente a Tomeu Melis y a Toni Nicolau, que me acompañaron en numerosas ocasiones, *gràcies per ser tan bona gent!*

A los técnicos de ADV y cooperativas que me acompañaron en las prospecciones y que me facilitaron muestras, Alejandro Aristondo, Tomás Salvà, María Teresa Ramis, María Marqués y Gonzalo Rodríguez.

Al Dr. Carlos Agustí-Brisach y a Eduardo Moralejo por acompañarnos en las prospecciones los primeros, y más duros, años.

A la Dra. Isabel Sastre, SEMILLA, y a la Dra. Josefina Bota por su apoyo, ánimos y resolución de dudas en el arranque de esta investigación.

A la Dra. Carme Garau, a la Dra. Vanesa Castillo y al doctorando Rafa Montero, del IRFAP por su apoyo, sus ánimos y por la resolución de dudas de último momento.

Quiero agradecer muy especialmente a María y a Diego, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, y por su paciencia y comprensión cuando papi se tenía que quedar a trabajar por las tardes o los fines de semana.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a Rafael y Consuelo, mis padres, que me enseñaron lo más importante que sé y a los que jamás podré devolver todo lo que me dieron.



# RESUMEN

---

El almendro es uno de los principales cultivos de Mallorca. Desde el año 2008, en parcelas de diferentes zonas de la isla se ha constatado la presencia de síntomas de decaimiento de ramas y muerte de almendros, que recuerdan en gran medida a los que han descrito diferentes autores en otras zonas del mundo causados por hongos patógenos de la madera en diversos cultivos. Para estudiar la etiología de esta problemática se realizaron prospecciones en parcelas de almendros distribuidas en las principales comarcas de cultivo de la isla durante seis años consecutivos (2009-2014). En estas prospecciones se caracterizaron los síntomas y se tomaron muestras que se analizaron en laboratorio. Los síntomas observados frecuentemente fueron: clorosis foliar, decaimiento generalizado y muerte de ramas, que se asociaban con síntomas internos en la madera, tales como: necrosis sectoriales, punteaduras y anillos oscuros en la zona vascular o presencia de madera esponjosa. En los análisis de laboratorio se obtuvieron 14 especies fúngicas de muestras de almendro: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus*, *Pleurostomophora richardsiae* y dos especies encontradas sólo en muestras de una parcela de albaricoqueros situada junto a parcelas de almendros: *Pm. minimum* y *Pm. venezuelense*. Entre las especies identificadas en almendro, *C. hispanica* y *Pm. amygdalinum* son dos nuevas especies fúngicas que han sido descritas a partir de aislados obtenidos en las prospecciones realizadas. Las especies más frecuentes en las parcelas de almendro estudiadas fueron *P. richardsiae* y *D. seriata*, seguidas por las otras especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae y por *C. hispanica*. Las especies que se aislaron con mayor frecuencia, fueron a su vez las que tuvieron una distribución más amplia; presentes en más comarcas. Posteriormente, se estudió la patogenicidad a almendro de algunas de las especies detectadas. Concretamente, se realizaron dos ensayos de patogenicidad, el primero de ellos se llevó a cabo durante dos años consecutivos (2013 y 2014) con las cinco especies de Botryosphaeriaceae (*D. olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*) y las dos de Diatrypaceae (*E. lata* y *E. leptoplaca*)

aisladas en las prospecciones, que se inocularon en árboles de 1 a 2 años de cuatro variedades diferentes de almendro ('Jordi', 'Ferragnes', 'Pons' y 'Vivot') plantados en una parcela experimental. El ensayo se evaluó transcurridos nueve meses desde la inoculación, midiendo la longitud total de las necrosis internas producidas. En este primer ensayo se demostró la patogenicidad a almendro de las siete especies que se ensayaron. Las especies que causaron las lesiones de mayor longitud fueron *N. luteum* el primer año de ensayo, y *N. parvum* y *N. mediterraneum* el segundo año. En ambos años, la especie que causó las lesiones de menor longitud fue *E. leptoplaca*. Además, se observó que la dimensión de la lesión producida por el hongo inoculado dependía de la variedad de almendro evaluada. En general, la variedad 'Jordi' fue la menos sensible el primer año de estudio, y 'Vivot' y 'Ferragnes' lo fueron el segundo año. En el segundo ensayo se estudió la patogenicidad de las especies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* y *P. richardsiae* en plantones de almendro de la variedad 'Ferragnes' en invernadero. En este caso, la evaluación se realizó a los seis meses de la inoculación, igualmente midiendo la longitud de las lesiones necróticas internas. Todas las especies inoculadas resultaron patógenas a almendro, siendo *P. richardsiae* la especie que causó la mayor longitud de lesión. Finalmente, se realizó un estudio de evaluación de fungicidas para la protección de heridas de poda frente a la infección por cuatro especies de Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*). Este estudio se llevó a cabo en dos fases; en primer lugar, una evaluación *in vitro* (reducción del crecimiento miceliar) con diez fungicidas y, posteriormente, una evaluación de cinco de estos fungicidas, elegidos entre los más efectivos *in vitro*, aplicándolos en heridas de poda uno o siete días tras el corte y la inoculación. Como en los casos anteriores, para evaluar este estudio se midió la longitud de la lesión, pero además también se calculó el porcentaje de reaislamiento del patógeno inoculado en cada caso. Los fungicidas tebuconazol y piraclostrobin, seguidos de ciproconazol y metil tiofanato, se mostraron como los más efectivos en la evaluación *in vitro*, mientras que el fungicida más efectivo para la protección de heridas de poda fue el metil tiofanato.

# RESUM

---

L'ametller és un dels principals cultius de Mallorca. Des de l'any 2008, en parcel·les de diferents zones de l'illa s'ha constatat la presència de símptomes de decaïment de branques i mort d'ametllers, que recorden en gran mesura als que diferents autors han descrit en altres zones del món causats per fongs de fusta en diversos cultius. Per estudiar l'etiologia d'aquesta problemàtica es van realitzar prospeccions en parcel·les d'ametllers en les principals comarques de cultiu de l'illa durant sis anys consecutius (2009-2014). En aquestes prospeccions es van caracteritzar els símptomes i es van prendre mostres que es van analitzar en el laboratori. Els símptomes freqüentment observats van ser: clorosi foliar, decaïment generalitzat i mort de branques, que s'associaven amb símptomes interns a la fusta, com ara necrosis sectorials, puntejades i anells foscos en la zona vascular o presència de fusta esponjosa. En les anàlisis de laboratori es van obtenir 14 espècies fúngiques de mostres d'ametller: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus* i *Pleurostomophora richardsiae* i dues espècies trobades només a una parcel·la d'albercoquers situada a prop de parcel·les d'ametllers: *Pm. minimum* i *Pm. venezuelense*. Entre les espècies identificades en ametller, *C. hispanica* i *Pm. amygdalinum* són dues espècies noves per a la ciència que han estat descrites a partir d'aïllats obtinguts en les prospeccions realitzades. Les espècies més freqüents en les parcel·les d'ametller estudiades van ser *P. richardsiae* i *D. seriata*, seguides per les altres espècies pertanyents a la família Botryosphaeriaceae i per *C. hispanica*. Les espècies que es van aïllar amb més freqüència, van ser a la vegada les que van tenir una distribució més àmplia; presents en més comarques. Posteriorment, es va estudiar la patogenicitat d'algunes de les espècies detectades sobre l'ametller. Concretament, es van realitzar dos assajos de patogenicitat. El primer d'ells es va dur a terme durant dos anys consecutius (2013 i 2014), amb les cinc espècies de Botryosphaeriaceae (*D. olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* i *N. parvum*) i les dues de Diatrypaceae (*E. lata* i *E. leptoplaca*) aïllades en les

prospeccions, que es van inocular en arbres d'1 a 2 anys de quatre varietats diferents d'ametller ('Jordi', 'Ferragnes', 'Pons' i 'Vivot') plantats en una parcel·la experimental. L'assaig es va avaluar transcorreguts nou mesos des de la inoculació, mesurant la longitud total de les necrosis internes produïdes. En aquest primer assaig es va demostrar la patogenicitat respecte l'ametller de les set espècies que es van assajar. Les espècies que van causar les lesions de major longitud van ser *N. luteum* el primer any d'assaig, i *N. parvum* i *N. mediterraneum* el segon any. En els dos anys dels assajos l'espècie que va causar lesions de menor longitud mitjana va ser *E. leptoplaca*. A més, es va observar que la dimensió de la lesió causada pel fong inoculat depenia de la varietat d'ametller avaluada. En general, la varietat 'Jordi' va ser la menys sensible el primer any d'estudi, i 'Vivot' i 'Ferragnes' ho van ser el segon any. En el segon assaig es va estudiar la patogenicitat de les espècies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* i *P. richardsiae* en plançons d'ametller de la varietat 'Ferragnes' en hivernacle. En aquest cas, l'avaluació es va realitzar als 6 mesos de la inoculació, igualment mesurant la longitud de les lesions necròtiques internes. Totes les espècies inoculades van resultar patògenes d'ametller, sent *P. richardsiae* l'espècie que va causar les lesions més extenses. Finalment, es va realitzar un estudi d'avaluació de fungicides per a la protecció de ferides de poda enfront de la infecció per quatre espècies de Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* i *N. parvum*). Aquest estudi es va dur a terme en dues fases, una avaluació *in vitro* (reducció del creixement micelià) amb 10 fungicides i, posteriorment, una avaluació de cinc d'aquests fungicides, elegits entre els més efectius *in vitro*, aplicant-los en ferides de poda a 1 o 7 dies després del tall i la inoculació. Com en els casos anteriors, per avaluar aquest estudi es va mesurar la longitud de la lesió, però a més també es va calcular el percentatge de reaïllament del patogen inoculat en cada cas. Els fungicides tebuconazol i piraclostrobin, seguits de ciproconazol i metil tiofanat, es van mostrar com els més efectius en l'avaluació *in vitro*, mentre que el fungicida més efectiu per a la protecció de ferides de poda va ser el metil tiofanat.

# ABSTRACT

---

Almond is one of the main crops of Majorca Island. Since 2008, symptoms of severe decline of almond trees have been observed in several orchards from different areas of the Island. Disease symptoms are similar to those described by different authors in other parts of the world caused by fungal trunk pathogens. In order to study the etiology of this problem, surveys were conducted on almond orchards distributed throughout the main growing regions in Majorca for six consecutive years (2009-2014). Disease symptoms included leaf chlorosis, general decay, and died branches. Internal wood symptoms ranged from brown to black vascular streaking, visible in cross sections as spots or circular discolouration of the xylem tissue, and wedge-shape necrosis or soft wood. Based on morphological and molecular identification, 14 fungal species were recovered from almond wood samples: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus* and *Pleurostomophora richardsiae* and two species were recovered from one apricots orchard near almonds orchards: *Pm. minimum* and *Pm. venezuelense*. Based on the DNA sequence analyses and morphological features, *C. hispanica* and *Pm. amygdalinum* proved distinct from all known species, and have been described. The most common species recovered from almond samples were *P. richardsiae* and *D. seriata*, followed by other species belonging to the family Botryosphaeriaceae and *C. hispanica*. The most frequently species isolated were also widely distributed and present in more regions. Subsequently, two pathogenicity tests were carried on almond trees by using representative isolates of some of the most frequent species. The first one was held for two consecutive years (2013 and 2014) with five species of Botryosphaeriaceae (*D. olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* and *N. parvum*) and two species of Diatrypaceae (*E. lata* and *E. leptoplaca*). Fungi were inoculated on 1-2 years old almond trees of four different cultivars ('Jordi', 'Ferragnes', 'Pons' and 'Vivot') under field conditions. Nine months after inoculation, the total length of internal necrosis was evaluated. All species were pathogenic on almond. *Neofusicoccum luteum* caused the longest average lesion during the first year,

and *N. mediterraneum* and *N. parvum* caused the longest lesion during the second year. *Eutypa leptoplaca* caused the shortest lesion length in both years of study. In addition, fungal lesion length varied depending on the variety of almond evaluated. In the first year of study, the more tolerant variety was 'Jordi', while in the second year, 'Ferragnes' and 'Vivot' varieties showed the highest degree of tolerance to fungal infection. In the second trial, almond seedlings variety 'Ferragnes' were inoculated with *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* and *P. richardsiae*. Six months after inoculation the lesion length was evaluated. All species inoculated were pathogenic on almond, being *P. richardsiae* the most virulent species. Finally, the ability of some commercial fungicides to protect pruning wounds from infection by four species of Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* and *N. parvum*) was evaluated. This study was conducted in two phases, an initial *in vitro* evaluation (mycelial growth assay) with 10 fungicides, followed by an evaluation of five fungicides, which proved to be effective in the *in vitro* trial, applied on pruning wounds at 1 and 7 days after inoculation. Internal lesion length and the percentage of re-isolation of the pathogen were calculated. tebuconazole and pyraclostrobin were the most effective fungicides in the *in vitro* evaluation, followed by cyproconazole and thiophanate-methyl. Thiophanate-methyl was the most effective fungicide to protect pruning wounds from infections caused by species of Botryosphaeriaceae.

# ÍNDICE DE CAPÍTULOS

---

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
I.1.	Origen, evolución e importancia del cultivo del almendro.	3
I.1.1.	El cultivo del almendro en Mallorca.	6
I.2.	Plagas y enfermedades del almendro en Mallorca.	14
I.3.	Enfermedades fúngicas de la madera en <i>Prunus</i> sp.	15
I.4.	La seca y muerte de almendros en Mallorca.	24
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>25</b>
<b>III.</b>	<b>HONGOS ASOCIADOS A LA SECA DE RAMAS Y MUERTE DE ALMENDROS EN LA ISLA DE MALLORCA.</b>	<b>29</b>
III.1.	Materiales y métodos.	31
III.1.1.	Muestreo y aislamiento de hongos.	31
III.1.2.	Identificación y caracterización morfológica.	35
III.1.3.	Identificación molecular.	37
III.2.	Resultados.	39
III.2.1.	Caracterización de síntomas.	39
III.2.2.	Identificación de hongos y su distribución.	43
III.3.	Discusión.	55
<b>IV.</b>	<b>PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE Y DIATRYPACEAE EN ALMENDRO.</b>	<b>61</b>
IV.1.	Materiales y métodos.	64
IV.1.1.	Material vegetal y plantación.	64
IV.1.2.	Aislados fúngicos.	65
IV.1.3.	Diseño del experimento.	66
IV.1.4.	Inoculación	67
IV.1.5.	Evaluación.	67
IV.1.6.	Análisis estadístico.	68
IV.2.	Resultados.	68
IV.3.	Discusión.	77

<b>V.</b>	<b>PATOGENICIDAD DE <i>COLLOPHORA HISPANICA</i>, <i>PLEUROS TOMOPHORA RICHARDSTAEY</i> Y <i>PHAEOACREMONIUM</i> SPP. EN ALMENDRO.</b>	<b>81</b>
V.1.	Materiales y métodos.	83
V.1.1.	Material vegetal.	83
V.1.2.	Aislados fúngicos.	84
V.1.3.	Diseño del experimento.	84
V.1.4.	Inoculación	85
V.1.5.	Evaluación.	85
V.1.6.	Análisis estadístico.	86
V.2.	Resultados.	86
V.3.	Discusión.	89
<b>VI.</b>	<b>EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA LA PROTECCIÓN DE HERIDAS DE PODA FRENTE A LA INFECCIÓN POR ESPECIES DE <i>BOTRYOSPHAERIA</i> EN ALMENDRO.</b>	<b>91</b>
VI.1.	Materiales y métodos.	95
VI.1.1	Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i> .	95
VI.1.1.1.	Cultivos fúngicos.	95
VI.1.1.2.	Fungicidas.	96
VI.1.1.3.	Diseño del experimento.	97
VI.1.1.4.	Lectura de resultados y cálculo de la CE <sub>50</sub>	97
VI.1.1.5.	Análisis estadístico	99
VI.1.2.	Evaluación de fungicidas <i>in planta</i> .	99
VI.1.2.1.	Material vegetal.	99
VI.1.2.2.	Fungicidas.	99
VI.1.2.3.	Especies fúngicas inoculadas y preparación del inóculo.	99
VI.1.2.4.	Tratamiento de las heridas de poda e inoculación de los patógenos.	100
VI.1.2.5.	Lectura de resultados.	101
VI.1.2.6.	Análisis estadístico.	103
VI.2.	Resultados	103
VI.2.1.	Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i> .	103
VI.2.2.	Evaluación de fungicidas <i>in planta</i> .	105
VI.3.	Discusión.	109
VI.3.1.	Ensayo <i>in vitro</i> .	109
VI.3.1.	Ensayo <i>in planta</i> .	110
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL.</b>	<b>113</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>127</b>
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>131</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.1.	Porcentaje de producción de almendra con cáscara de los principales países productores en relación a la producción total mundial en el año 2013.	6
Figura 1.2.	Concentración de recintos y parcelas con presencia de almendros según datos de las ayudas P.A.C. 2015.	12
Figura 1.3.	Evolución del precio de la almendra con cáscara en España entre los años 2003 y 2014.	13
Figura 3.1.	Síntomas externos de clorosis de hojas, seca de brotes, decaimiento, marchitez, colapso de ramas y muerte de árboles, asociados a hongos patógenos de la madera en almendro y albaricoquero.	40
Figura 3.2.	Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro.	41
Figura 3.3.	Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro en las que se observan necrosis sectoriales de márgenes bien definidos, en cuña.	41
Figura 3.4.	Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro en las que se observan necrosis sectoriales de márgenes irregulares.	42
Figura 3.5.	Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro en las que se observan tejidos descompuestos de consistencia esponjosa y galerías de insectos.	42
Figura 3.6.	Características morfológicas de <i>Collophora hispanica</i> .	45
Figura 3.7.	Características morfológicas de <i>Phaeoacremonium amygdalinum</i> .	47
Figura 3.8.	Porcentajes de parcelas donde se aisló cada hongo.	52
Figura 3.9.	Porcentajes de comarcas donde se aisló cada hongo.	52

Figura 3.10.	Frecuencia de las especies fúngicas aisladas en cada una de las tres comarcas más relevantes, expresada como porcentaje de parcelas donde se encontró la especie sobre el total de parcelas prospectadas en la comarca.	54
Figura 4.1.	Vista general de la parcela en junio de 2013, dos meses después de la inoculación del primer año.	64
Figura 4.2.	Vista aérea de la parcela donde se realizaron los ensayos de inoculación con representación de los 4 bloques y la distribución de las 4 variedades de almendro en cada uno de ellos.	65
Figura 4.3.	Detalle del proceso de inoculación con especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae.	67
Figura 4.4.	Vista general y detalle de los síntomas observados a los 4 meses de la inoculación en algunos de los almendros inoculados en el ensayo de patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae.	69
Figura 4.5.	Detalle de las necrosis internas producidas en almendro por especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae.	70
Figura 4.6.	Representación de la media de las longitudes (cm) de las lesiones internas causadas por especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en el año 2013 en las cuatro variedades de almendro inoculadas.	72
Figura 4.7.	Representación de la media de las longitudes (cm) de las lesiones internas causadas por especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en el año 2014 en las cuatro variedades de almendro inoculadas.	73
Figura 5.1.	Detalle del proceso de inoculación con <i>Collophora hispanica</i> , <i>Phaeoacremonium amygdalinum</i> , <i>Phaeoacremonium iranianum</i> , <i>Pleurostomophora richardsiae</i> .	85
Figura 5.2.	Necrosis interna en almendros de la variedad 'Ferragnes' causada 6 meses después de la inoculación con aislados de <i>Collophora hispanica</i> , <i>Phaeoacremonium amygdalinum</i> , <i>Phaeoacremonium iranianum</i> , <i>Pleurostomophora richardsiae</i> y el control (PDA).	87

Figura 5.3.	Representación de la media de la longitud de la necrosis interna causada por <i>Collophora hispanica</i> , <i>Phaeoacremonium amygdalinum</i> , <i>Phaeoacremonium iranianum</i> , <i>Pleurostomophora richardsiae</i> y el control (PDA) en almendros de la variedad 'Ferragnes' 6 meses después de la inoculación.	88
Figura 6.1.	Detalle del proceso de cultivo en medio PDA con fungicida para el ensayo <i>in vitro</i> de fungicidas para el control de especies de Botryosphaericaeae.	98
Figura 6.2.	Detalle del ensayo de evaluación del efecto de fungicidas sobre heridas de poda.	101
Figura 6.3.	Fragmento del tronco de uno de los almendros inoculados en el ensayo de evaluación del efecto de fungicidas sobre heridas de poda, descortezado parcialmente para realizar la evaluación del ensayo.	102
Figura 6.4.	Valores de la longitud media (cm) de las lesiones producidas en almendros por el conjunto de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae inoculados a los uno y siete días de la realización del corte de poda y tratamiento fungicida.	106
Figura 6.5.	Valores medios del porcentaje de reaislamiento hongos de la familia Botryosphaeriaceae inoculados a los uno y siete días de la realización del corte de poda y tratamiento fungicida.	108

# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1.1.	Superficie y producción de almendra en las distintas Comunidades Autónomas de España.	9
Tabla 1.2.	Relación entre la superficie total de cultivo de almendros y la superficie de cada Comunidad Autónoma.	10
Tabla 1.3.	Superficie (ha) dedicada al cultivo de almendro declaradas en la ayudas de la Política Agrícola Común en 2015 en las comarcas de Mallorca	10
Tabla 1.4.	Superficie (ha) de cultivo de almendro declaradas en la ayudas de la PAC en 2015 en los municipios de Mallorca.	11
Tabla 1.5.	Listado de hongos patógenos de la madera aislados de <i>Prunus</i> spp. y su distribución mundial.	21
Tabla 3.1.	Localización de las parcelas muestreadas, variedades principales, edad aproximada de los árboles, número de muestreos y años en los que se realizaron.	33
Tabla 3.2.	Regiones secuenciadas y cebadores utilizados para la identificación molecular de cada familia o género de hongos aislados.	38
Tabla 3.3.	Hongos aislados en las parcelas prospectadas en las fechas mostradas a partir de muestras de almendro con síntomas de decaimiento y muerte de ramas tomadas en las mismas.	48
Tabla 3.4.	Hongos aislados en las parcelas prospectadas a partir de muestras de almendro con síntomas de decaimiento y muerte de ramas tomadas en las mismas.	50
Tabla 3.5.	Especies fúngicas aisladas en las prospecciones en parcelas de almendros y albaricoqueros con síntomas de decaimiento y muerte de ramas entre 2009 y 2014, junto con el número de parcelas y comarcas en las que se encontraron dichas especies y los porcentajes respectivos respecto al total de parcelas y comarcas prospectadas.	51
Tabla 4.1.	Aislados y origen de las especies de hongos de las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae que se eligieron para los ensayos de patogenicidad.	66

Tabla 4.2.	Media y error estándar de las longitudes de las lesiones internas causadas por especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en las cuatro variedades de almendro inoculadas en los dos años del ensayo.	71
Tabla 5.1.	Especies, códigos, localización del origen y año de aislamiento de los aislados utilizados en el ensayo de patogenicidad.	84
Tabla 5.2.	Longitudes medias de las necrosis (mm) y su error estándar generadas por cada aislado de <i>Collophora hispanica</i> , <i>Phaeoacremonium amygdalinum</i> , <i>Phaeoacremonium iranimum</i> , <i>Pleurostomophora richardsiae</i> ensayados 6 meses después de la inoculación.	87
Tabla 6.1.	Aislados y origen de las especies de hongos que se eligieron para el ensayo de control.	95
Tabla 6.2.	Características de los fungicidas utilizados en la evaluación <i>in vitro</i> respecto al crecimiento miceliar.	96
Tabla 6.3.	Valores CE <sub>50</sub> de distintos fungicidas para la inhibición del crecimiento miceliar de <i>D. seriata</i> , <i>N. luteum</i> , <i>N. mediterraneum</i> y <i>N parvum</i> .	103
Tabla 6.4.	Resultado del análisis de la varianza correspondiente al ensayo de fungicidas <i>in planta</i> , sobre la longitud de la lesión en heridas de poda tratadas con distintos fungicidas, e inoculadas a distintos tiempos con distintos hongos patógenos.	106
Tabla 6.5.	Resultado del análisis de la varianza correspondiente al ensayo de fungicidas <i>in planta</i> sobre el porcentaje de reaislamiento a partir de heridas de poda tratadas con distintos fungicidas, e inoculadas a distintos tiempos con distintos hongos patógenos.	107



# I. Introducción

---





# I. INTRODUCCIÓN

---

## **I.1. ORIGEN, EVOLUCIÓN E IMPORTANCIA DEL CULTIVO DEL ALMENDRO.**

El almendro cultivado pertenece a la familia Rosaceae del orden Rosales. Se puede encontrar en la bibliografía con distintas denominaciones: *Prunus amygdalus* (L.) Batsch, *P. dulcis* (Miller) D. A. Webb y *P. communis* (L.) Arcang. En 1964, debido a las discrepancias creadas, el Comité General de Nomenclatura Botánica propuso para el almendro cultivado dulce el nombre científico *P. dulcis*, aceptando como sinónimos *P. amygdalus* y *P. communis* (Felipe, 2000).

El almendro es un árbol de hoja caduca, de un solo tronco, liso al principio, rugoso y agrietado con el paso de los años. Las hojas son lanceoladas de color verde brillante. Sus yemas se sitúan en ramos mixtos, con yemas de madera y de flor; ramos de madera, sólo yemas con de madera; o en ramilletes de mayo, con yemas de flor excepto la yema terminal que es de madera. Sus flores son hermafroditas, de pétalos blancos o rosáceos. Suelen ser autoincompatibles, pero presentan buena polinización cruzada entre variedades. El fruto difiere ligeramente del resto de frutales de hueso, ya que el mesocarpo es poco desarrollado, verde, pubescente y no comestible. La parte comestible es la semilla, que se aloja dentro de un endocarpo lignificado. Las variedades pueden agruparse en dos grupos, por un lado, los almendros de semillas amargas, con productividad y rusticidad elevadas, empleadas en industria. Por otro lado, están los almendros de semillas dulces, donde encontramos las almendras de cáscara dura, las de cáscara semidura y las de cáscara blanda o mollares (Agustí, 2004).

Su origen se sitúa en regiones montañosas de Asia Central y, actualmente, todavía se encuentran poblaciones espontáneas desde las montañas de Tian Shan (localizadas en la región fronteriza entre Kazajistán, Kirguistán y la República Popular China) hasta el Kurdistán. El estudio de estos ancestros por botánicos rusos en la primera mitad del siglo XX expuso que el origen del almendro cultivado podría encontrarse en el cruce de *P. fenzliana* Fritsch, *P. bucharica* (Korsh.) Hand.-Mazz. y *P. kuramica* (Korsh.) Kitam. (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Otro posible origen podría ser la domesticación de *P. communis*, dadas las similitudes entre esta especie y la forma cultivada (Kester *et al.*, 1990; Felipe, 2000).

La Biblia recoge las que son posiblemente las primeras referencias a la existencia del almendro en la tierra de Canaán: "Al día siguiente, cuando Moisés entró en la Tienda del Testimonio, la varilla de la tribu de Leví presentada por Aarón había florecido: le habían aparecido yemas, había botones de flores y las almendras habían madurado" (Gén. 17, 23) o "Jacob se buscó entonces unas ramas verdes de chopo, almendro y plátano. Peló la corteza de las ramas haciendo franjas que dejaban al descubierto el blanco de la madera" (Gén. 30, 37). Estas referencias en la Biblia ponen de manifiesto que el almendro ya era cultivado por los hebreos a finales del siglo XVI a. C. Lo conocían como *Shaked*, que deriva del verbo *Shakod*, que significa adelantarse o apresurarse, lo que es una clara referencia a la floración temprana del almendro. En hebreo bíblico y postbíblico la palabra utilizada para la almendra es *loz* o *luz*, de donde derivan las palabras castellanas *alozza* para la almendra verde o *almendrón* y *alozzo* para referirse al almendro borde (Rallo y Sacarés, 1997).

Los griegos lo denominaron *Amygdala* (proveniente del siríaco *Hamigdala* que significa árbol hermoso). Teofrasto, entre los siglos IV y III a. C., ofrece consejos sobre su cultivo en su obra *De historia plantarum*.

Los romanos le cambiaron el nombre a *Amygdalus*. Columela en el siglo I recomendaba su plantación en terrenos secos para evitar pudriciones. El almendro alcanza su máxima difusión con los romanos, aunque en muchas

zonas del imperio ya fuera conocido con anterioridad. Así, en la Península Ibérica según Rallo y Sacarés (1997), su introducción se debería fijar en el período de establecimiento de los Fenicios y, posteriormente, los Griegos (S. XI a VI a. C.).

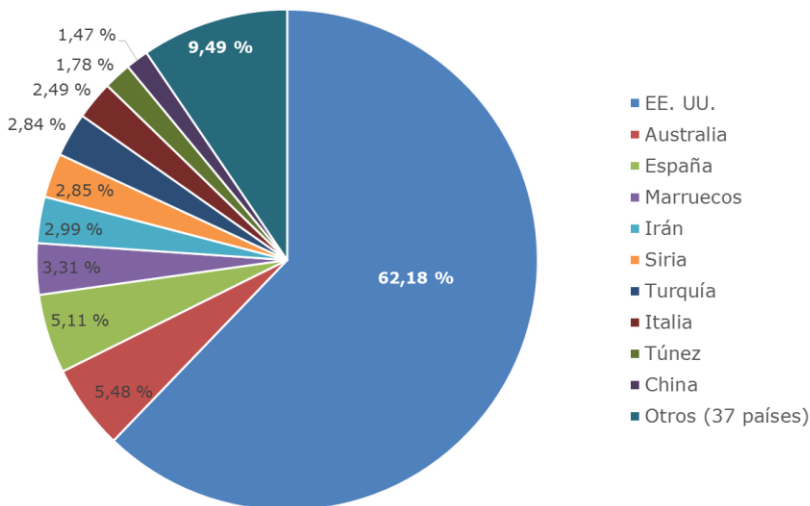
Siglos más tarde, Carlomagno (S. VIII) recomendó plantar almendros en regiones meridionales de su imperio. A pesar de todas estas referencias históricas, en realidad el cultivo del almendro evoluciona poco hasta el siglo XIX, en la mayoría de las veces con presencia de algunos almendros poco cuidados en las cercanías de las viviendas rurales, aunque en algunas zonas se pudieron constituir vergeles cuando las condiciones le fueron propicias: Sicilia, Baleares, Islas del Egeo, etc. (Riera y Ferrán, 1970; Felipe, 2000).

La diseminación del cultivo se vio favorecida por el hecho de que la semilla era al mismo tiempo el material de propagación y la parte comestible (Kester *et al.*, 1990). Felipe (2000) resume en tres etapas la domesticación del almendro. La primera sería el cultivo en diferentes civilizaciones asiáticas, la segunda su expansión a países de la cuenca mediterránea, llevada a cabo inicialmente por los fenicios (2000 a. C.), continuada posteriormente por hebreos, griegos y romanos. Finalmente, la tercera etapa, es la introducción del almendro en California, a partir de 1836, con variedades llevadas desde Francia, en este mismo período el almendro fue llevado también a Australia, Sur de África y de América.

En los orígenes de su cultivo, el almendro se consideraba marginal, complementaba esporádicamente la economía familiar y no se buscaba rentabilidad en su producción. No fue hasta su introducción en California cuando se inició el cultivo del almendro de forma diferente, las técnicas evolucionaron, se intensificaron las plantaciones y se regaron, aumentando la producción y superando notablemente la obtenida en países tradicionalmente productores de la cuenca mediterránea. Como en muchos otros cultivos, al comprobarse la capacidad productora y la rentabilidad que puede obtenerse se iniciaron estudios sobre su fisiología, mejora genética o patrones más adecuados a diferentes

condiciones de cultivo. Con ello se renovó el concepto que se tenía del almendro, pasando a considerarse una especie frutal más (Felipe, 2000).

En el año 2013 en todo el mundo se produjeron  $2,9 \times 10^6$  t de almendras al año, siendo EE. UU. el primer productor con  $1,8 \times 10^6$  t, seguido de Australia con  $160 \times 10^3$  t, España ( $149 \times 10^3$  t), Marruecos ( $96 \times 10^3$  t), Irán ( $87 \times 10^3$  t) Siria ( $83 \times 10^3$  t), Turquía ( $82 \times 10^3$  t) e Italia ( $72 \times 10^3$  t) (Faostat, 2013). En la Figura 1.1 se muestra el porcentaje de producción de los principales países productores respecto a la producción total.



**Figura 1.1.** Porcentaje de producción de almendra con cáscara de los principales países productores en relación a la producción total mundial en el año 2013 (Faostat, 2013).

### I.1.1. EL CULTIVO DEL ALMENDRO EN MALLORCA

En relación al cultivo del almendro en Mallorca, Rallo y Sacarés (1997), en su revisión titulada *La historia de l'ametler a Mallorca mitjançant la bibliografia*, repasan la historia del almendro en la isla mediante detalladas citas bibliográficas desde el siglo XVIII hasta la década de los 90 del siglo XX. Según estos autores, en Mallorca la referencia más antigua al almendro se puede datar

alrededor del año 400 a. C., en la que se citan unas almendras encontradas entre los restos de un naufragio procedente posiblemente de Sicilia o Cártago. En cualquier caso, este hallazgo no implica la existencia del cultivo en la isla.

Rubí (1980), propone a los romanos como los probables responsables de la introducción del almendro en Mallorca, aunque afirma que no es hasta el siglo XIX cuando su cultivo adquiere una importancia creciente en la isla, debido fundamentalmente a dos causas. La primera sería la parcelación de las grandes fincas y la segunda el ataque de filoxera que sufrieron los viñedos mallorquines y que provocó la desaparición de alrededor de 30.000 ha de este cultivo, siendo sustituido casi en su totalidad por el almendro.

En la década de 1920, el cultivo del almendro alcanza su máximo esplendor en la isla (Rubí, 1980), convirtiéndose Mallorca en pionera en la investigación y experimentación en este cultivo, y siendo un importante emisor de las técnicas y sistemas de cultivo al resto de España (Rallo y Sacarés, 1997). En Mallorca la superficie de cultivo aumentaba, viéndose éste favorecido por las excelentes condiciones climáticas y por una creciente demanda del mercado. Sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo XX la situación cambió, perdiendo Mallorca su liderazgo en España tanto en superficie como en producción. Rubí (1980) culpa de este cambio al incremento de los costes de producción, a la expansión del turismo en esos años que se llevó consigo mano de obra agrícola y a la falta de adaptación a la mecanización y nuevas técnicas de cultivo. Este autor resume en seis puntos la problemática del almendro en los años 80 del siglo pasado:

1. Edad avanzada de los árboles.
2. Plantaciones realizadas en terrenos no aptos.
3. Ausencia de abonado y labores de cultivo deficientes.
4. Abandono de las podas.

5. Nula atención en cuanto a tratamientos contra plagas y enfermedades.
6. Escasa y errónea selección de variedades con consecuencias en la producción por falta de variedades polinizantes aptas, así como en la comercialización por ofrecer almendra sin tipificación.

A pesar de ello, la almendra continuó siendo uno de los productos más importantes de Mallorca, como se refleja en los trabajos realizados por Palazón (1968, 1970) o Pons y Simonet (1970), que se desarrollaron a partir de estudios en la isla sobre variedades autóctonas o planes de reestructuración.

Finalmente, a partir del año 1992 la mayor parte de las explotaciones de cultivo de almendra se incluyeron en planes de mejora y ayudas como las de la Política Agraria Común, constituyéndose a su vez las Organizaciones de Productores de Frutos y Hortalizas para la recepción de las ayudas europeas. Con el impulso de las ayudas el sector se estructuró, potenciándose su profesionalización y competitividad. Como contrapartida, los planes de mejora también impulsaron el arranque de plantaciones de árboles viejos de variedades locales, con más de 25 años, y su sustitución por nuevas variedades con, a priori, mejor salida comercial y que no se cultivaban en Mallorca hasta ese momento. A esto también contribuyó la no disponibilidad de variedades autóctonas en los viveros, siendo el resultado final la pérdida de muchas de estas variedades. Además, entre las nuevas variedades recomendadas en los planes de mejora se encontraba 'Ferragnes', que por su productividad y calidad parecía una buena variedad para la recuperación del sector del almendrero mallorquín y fue la que principalmente se plantó. Sin embargo, con el paso de los años, se ha comprobado su elevada susceptibilidad al hongo *Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla (Tuset y Portilla, 1989) y las condiciones ambientales tan favorables en la isla para el desarrollo de la enfermedad en el almendro. Este hecho hace casi inviable su cultivo de esta variedad en Mallorca. Por ello gran parte de las parcelas donde se encontraba la variedad 'Ferragnes' están siendo reinjertadas o replantadas con otras variedades.

Si observamos los datos que ofrece el anuario de estadística agraria (Anónimo, 2014), (Tablas 1.1 y 1.2), Baleares, con algo más de 24.000 ha dedicadas al cultivo del almendro, ocupa el séptimo lugar entre las comunidades autónomas españolas en lo que se refiere a superficie dedicada al cultivo. No obstante, en términos relativos y teniendo en cuenta la superficie total de cada región, Baleares ocupa el segundo lugar sólo por detrás de Murcia, lo que confirma el interés que tiene este cultivo en las islas.

**Tabla 1.1.** Superficie y producción de almendra en las distintas comunidades autónomas de España (Fuente: Anuario de Estadística Agraria de 2014)

	ha en secano	ha en regadío	ha totales	Producción total (t)
Total España	490.590	43.468	534.053	143.081
Andalucía	146.188	6.222	152.310	25.208
Com. Valenciana	91.345	9.029	100.374	28.177
Región de Murcia	66.014	6.878	72.892	25.519
Aragón	59.226	7.474	66.700	23.525
Castilla la Mancha	52.584	7.232	59.816	15.030
Cataluña	35.001	3.912	38.913	12.294
Baleares	24.123	320	24.443	7.013
La Rioja	9.008	560	9.568	1.567
Extremadura	2.482	529	3.011	1.381
Navarra	2.330	1.284	3.614	2.053
Castilla y León	1.324	22	1.346	374
Madrid	780	0	780	595
Canarias	209	6	203	249
País Vasco	75		75	95

**Tabla 1.2.** Relación entre la superficie total de cultivo de almendros y la superficie de cada Comunidad Autónoma (Fuente: Anuario de Estadística Agraria de 2014).

	<b>ha almendro</b>	<b>Superficie km<sup>2</sup></b>	<b>% de ha de almendro respecto a las ha totales</b>
Total España	534.053	504.645	1,06
Región de Murcia	72.892	11.313	6,44
Baleares	24.443	4.992	4,90
Com. Valenciana	100.374	23.255	4,32
Andalucía	152.310	87.268	1,75
Aragón	66.700	47.719	1,40
Cataluña	38.913	32.107	1,21
Castilla la Mancha	59.816	79.463	0,75

Concretando en la isla de Mallorca, el almendro se distribuye por todas las comarcas y la mayoría de municipios, como podemos apreciar en las Tablas 1.3 y 1.4, aunque con menos preponderancia en la comarca de Tramuntana, terreno que es ocupado por olivares, y la de Palma que siendo además la más pequeña en superficie también es la que más zonas urbanas e industriales aúna, dejando menos espacio para la agricultura y para el cultivo del almendro.

**Tabla 1.3.** Superficie (ha) dedicada al cultivo de almendro declaradas en la ayudas de la Política Agrícola Común en 2015 en las comarcas de Mallorca (Fuente: Área de Estadística de la Conselleria de Mediambient, Agricultura i Pesca, comunicación personal, junio de 2015).

<b>Comarca</b>	<b>Superficie (ha)</b>
Raiguer	3833,72
Migjorn	3461,46
Pla	2999,82
Llevant	2657,47
Serra de Tramuntana	1198,87
Palma	764,88

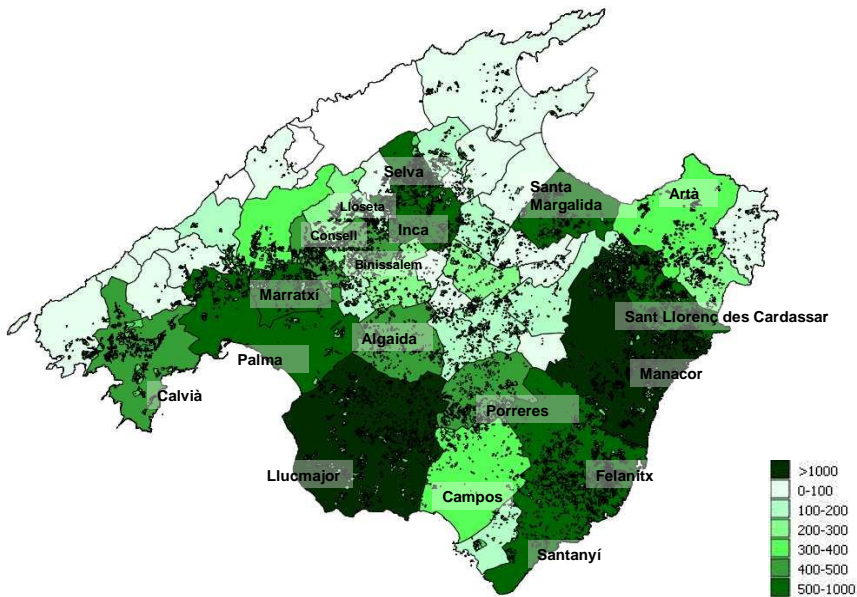


**Tabla 1.4.** Superficie (ha) de cultivo de almendro declaradas en las ayudas de la P.A.C. en 2015 en los municipios de Mallorca (Fuente: Área de Estadística de Conselleria de Mediambient, Agricultura i Pesca, comunicación personal, junio de 2015)

<b>Municipio</b>	<b>Comarca</b>	<b>Ha de almendros</b>	<b>Grupo</b>
Llucmajor	Migjorn	1705,25	>1000
Manacor	Llevant	1317,85	>1000
Marratxí	Raiguer	814,03	500-1000
Palma	Palma	764,88	500-1000
Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	702,21	500-1000
Felanitx	Migjorn	669,35	500-1000
Santanyí	Migjorn	619,26	500-1000
Selva	Raiguer	612,64	500-1000
Inca	Raiguer	566,73	500-1000
Santa Margalida	Pla	512,11	500-1000
Calvià	Serra de Tramuntana	477,14	400-500
Santa Maria del Camí	Raiguer	452,68	400-500
Binissalem	Raiguer	431,06	400-500
Algaida	Pla	418,06	400-500
Porreres	Pla	414,26	400-500
Artà	Llevant	370,27	300-400
Bunyola	Serra de Tramuntana	338,42	300-400
Campos	Migjorn	327,97	300-400
Sineu	Pla	284,53	200-300
Sencelles	Pla	279,74	200-300
Alaró	Raiguer	241,33	200-300
Son Servera	Llevant	212,69	200-300
Consell	Raiguer	201,89	200-300
Montuïri	Pla	198,47	100-200
Llubí	Pla	187,11	100-200
Sant Joan	Pla	181,92	100-200
Lloseta	Raiguer	172,6	100-200
Ses Salines	Migjorn	139,63	100-200
Petra	Pla	136,19	100-200
Valldemosa	Serra de Tramuntana	127,57	100-200
Santa Eugenia	Pla	103,75	100-200
Campanet	Raiguer	103,23	100-200
Andratx	Serra de Tramuntana	88,02	0-100
Sa Pobla	Raiguer	76,7	0-100
Puigpunyent	Serra de Tramuntana	75,58	0-100
Maria de la Salut	Pla	74,58	0-100
Lloret de Vistalegre	Pla	65,75	0-100

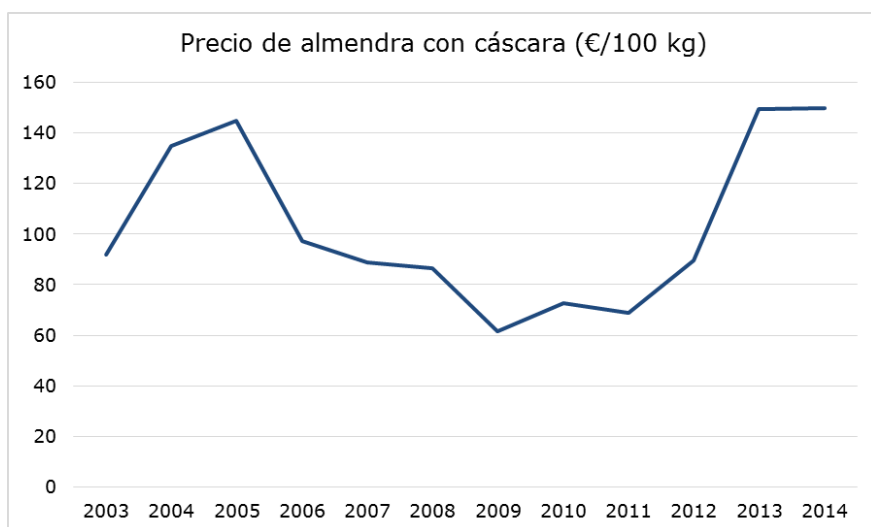
**Tabla 1.4.** Superficie (ha) de cultivo de almendro declaradas en las ayudas de la P.A.C. en 2015 en los municipios de Mallorca (continuación).

Municipio	Comarca	Superficie (ha)	Grupo
Ariany	Pla	63,86	0-100
Buger	Raiguer	62,6	0-100
Esporles	Serra de Tramuntana	62,13	0-100
Capdepera	Llevant	54,45	0-100
Alcudia	Raiguer	49,81	0-100
Mancor de la Vall	Raiguer	48,42	0-100
Costix	Pla	43,57	0-100
Muro	Pla	35,92	0-100
Pollença	Serra de Tramuntana	26,18	0-100
Villafranca de Bonany	Pla	9,3	0-100
Sóller	Serra de Tramuntana	1,38	0-100
Estellenc	Serra de Tramuntana	1,37	0-100
Banaylbufar	Serra de Tramuntana	1,08	0-100



**Figura 1.2.** Concentración de recintos y parcelas con presencia de almendros según datos de las ayudas P.A.C. 2015 La superficie de cada municipio aparece en color según el total de hectáreas de almendro declaradas (Fuente: Área de Estadística de Conselleria de Mediambient, Agricultura i Pesca, comunicación personal, junio de 2015)

En cuanto al comercio de la almendra, según el Informe de diagnóstico sobre el sector de la almendra de Mallorca (Conselleria d'Agricultura i Pesca, 2009), entre 2006 y 2011 la bajada de precios causó una leve crisis del sector. La tendencia a la baja de los precios fue consecuencia de la competencia con la almendra procedente de California y Australia. Sin embargo, en la actualidad se observa una subida de precios en España desde el año 2012 (Figura 1.3) consecuencia de la alta demanda a nivel mundial, especialmente de países como China (Zhengzhou y Gale, 2015) o India (Mishra, 2015). España exportó almendras por un valor de 457,2 M€ en 2014, lo que supuso un incremento del 28,35 % respecto al año 2013 (Anónimo, 2014b). Este aumento de la demanda podría deberse en gran parte a la publicación reciente de estudios sobre la importancia de los frutos secos en la prevención de problemas cardiovasculares (Estruch *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2014)



**Figura 1.3.** Evolución del precio de la almendra con cáscara en España (€/100 kg) entre los años 2003 y 2014 (Fuente: Anuario de Estadística Agraria de 2014)

## **I.2. PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL ALMENDRO EN MALLORCA.**

Los problemas fitosanitarios del almendro en Mallorca son semejantes a los de otras zonas del cultivo en el mediterráneo.

Entre las plagas habituales encontramos el tinguado *Monosteira unicastata* (Mulsant & Rey, 1852) que, junto a los pulgones, habitualmente de las especies *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) o *Hyalopterus amygdali* (E. Blanchard, 1840) y, en menor medida, *Pterochloroides persicae* (Cholodkovski, 1899), suelen ser las únicas para las que se realizan tratamientos insecticidas en la isla. El gusano cabezudo *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1758) también es frecuente, causando problemas en los secanos con almendros injertados sobre patrones híbridos. En cuanto a otros coleópteros, los escolítidos son frecuentes afectando a almendros en municipios como Llucmajor o Campos, en el sur de la isla. Además, el chinche pentatómido *Solenosthedium bilunatum* (Lefèbvre, 1827) y la cochinilla *Gueriniella serratulae* (Fabricius, 1775) requieren una mención especial, dada su elevada incidencia en la isla y ser estas plagas poco conocidas en la península (Anónimo 2010b; Anónimo 2011).

En cuanto las enfermedades del almendro en Mallorca, una de las que más preocupa es el chancro de ramillas conocido comúnmente en Mallorca como "brot sec", causado por *P. amygdali*, con ataques graves especialmente en las plantaciones de la variedad 'Ferragnes' por su gran susceptibilidad a este hongo. Otra enfermedad de origen fúngico frecuente, sobre todo en terrenos húmedos y plantaciones profundas, es la conocida en Mallorca como "mòrbol" o "morbo", que no es más que la pudrición de raíces y cuello causada por *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm, que Ballester (1916) ya recogía en su trabajo sobre plagas y enfermedades del almendro en Baleares. Menos frecuentes, pero también presentes en la isla son los siguientes patógenos que afectan al almendro: *Monilinia* spp., *Polystigma amygdalinum* P.F. Cannon causante de la enfermedad conocida como mancha ocre, *Stigmina carpophila* (Lév.) M. B. Ellis, causante del cribado de los frutales de hueso y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Smith

& Townsend) Conn, todos ellos, ampliamente distribuidos en España y otros países (De Cal y Melgarejo, 2000; Ogawa *et al.*, 2000; Anónimo, 2010a; Melgarejo *et al.*, 2010).

### **I.3. ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA EN *PRUNUS* SPP.**

Las enfermedades fúngicas de la madera están ocasionadas por un conjunto de hongos patógenos en especies leñosas que causan síntomas complejos y variados, pero que, en cualquier caso, producen una alteración interna de la madera por necrosis o podredumbre seca (García *et al.*, 2005).

Estas patologías han sido muy estudiadas en los últimos años en el cultivo de la vid debido a que ha aumentado considerablemente la incidencia de las mismas en los viñedos de todo el mundo, entre otras cosas, debido a la supresión de los tratamientos con arsenito sódico (Chiarappa, 2000; Graniti *et al.*, 2000). Paralelamente, el conocimiento de los agentes causales de estas enfermedades ha mejorado (Gramaje y Armengol, 2011; Úrbez-Torres, 2011; Berstch *et al.*, 2013; Gramaje *et al.*, 2015).

En otras especies leñosas de interés agrícola también se conocen las enfermedades fúngicas de la madera. Algunas comunes son los chancros causados por *Nectria galligena* Bres. en frutales de pepita, los chancros de ramillas causados por *Phomopsis* spp., los chancros y secas causados por *Valsa* sp., el mal del plomo de los frutales de hueso originado por el basidiomiceto *Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar y la eutipiosis causada por *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (Mateo-Sagasta, 2000a, 2000b, 2000c; Tuset, 2000; Melgarejo, 2000;). Sin embargo, también en estos y otros cultivos es cada vez más importante la presencia de nuevas patologías de la madera.

En olivo, Moral *et al.* (2010) identificaron *Neofusicoccum mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips y *Diplodia seriata* De Not. causando seca de

ramas tanto en España como en California. Posteriormente, Úrbez-Torres *et al.* (2013) identificaron 18 especies fúngicas asociadas a decaimiento de brotes y ramas de olivo en California siendo *N. mediterraneum* y *D. mutila* (Fr.) Mont. las que se mostraron más agresivas en los ensayos de patogenicidad.

En aguacates en California, McDonlad y Eskalen (2011) encontraron seis especies de Botryosphaeriaceae asociadas a chancros de ramas.

En California también se han encontrado hongos patógenos de la madera asociados a decaimientos de ramas de cítricos, concretamente las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, *Spencermartinsia viticola* (A.J.L. Phillips & J. Luque) A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous (= *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque), *Do. iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, *N. australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. magniferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. mediterraneum*, *N. luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *D. mutila* y *Eutypella* spp. (Adesemoye y Eskalen, 2011a, 2011b; Eskalen *et al.*, 2011). También en cítricos, recientemente se ha encontrado hongos basidiomicetos, siendo *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. el principal hongo asociado a pudriciones de madera en este cultivo en el sur de Italia, encontrándose también *Phellinus* spp., aunque con menor frecuencia (Rocchetti *et al.*, 2014).

Si nos centramos en el género *Prunus*, diferentes estudios han demostrado que las plantas de este género son hospedantes habituales de hongos causantes de enfermedades de la madera. Así, por ejemplo, algunas especies de Botryosphaeriaceae como *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., son patógenos bien conocidos en melocotonero (*P. persica* (L.) Bastch) en todo el mundo (Pusey *et al.*, 1995). Farr *et al.* (1989) enumeran estas mismas tres especies, así como *Neofusicoccum ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *Aplosporella peckii* (Sacc.) House en *Prunus* spp. en los EE. UU. *D. mutila* fue citada en melocotonero por Laudon (1973) en Nueva

Zelanda y posteriormente por Sutton (1980) en albaricoquero (*P. armeniaca* L.) y de nuevo en melocotonero. Slippers *et al.* (2007) hallaron varias cepas de *D. seriata* y *N. australe* en frutales de hueso en Sudáfrica. *Diplodia rosulata* Gure Slippers & Stenlid está descrita en *P. africana* (Hook, F.) Kallman en Etiopía. Por otro lado, Wollenweber (1941) citaba a *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque en albaricoquero y otros *Prunus* spp. en Europa y Norteamérica. Wollenweber y Hochapfel (1941) consideran *D. roumegueri* var. *santonensis* Brunaud sinónimo de *D. phoradendri* Cooke, que se había encontrado en 1892 en *P. laurocerasus* en Francia. Por otro lado, Damm *et al.* (2007a) determinaron la diversidad de los miembros de la familia Botryosphaeriaceae aislados de madera sintomática de albaricoquero, nectarina (*P. persica* var. *nucipersica* (L. ex Borkh.) C.K. Schneid.), melocotonero y ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.) en Sudáfrica. Entre ellos *D. seriata*, *D. pinea* (Desm.) J. Kickx F., *D. mutila*, *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum vitifusiforme* (Van Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *N. australe*, y dos especies previamente desconocidas, *D. africana* Damm & Crous en nectarina y *Lasiodiplodia plurivora* Damm & Crous en ciruelo japonés. En Italia se aisló *D. seriata* en *P. laurocerasus*, asociado a chancros de ramillas (Quaglia *et al.*, 2013). Las prospecciones de especies de Botryosphaeriaceae en almendros en California concluyeron con seis nuevas citas en este hospedante y el descubrimiento de una nueva especie, *Neofusicoccum nonquaesitum* Inderb., Trouillas, Bostock & Michailides (Inderbitzn *et al.*, 2010). Algunas especies de *Aplosporella* se han aislado de ramitas de *Prunus* spp., concretamente *A. indica* D.K. Agarwal, Chowdhry & A.K. Sarbhoy y *A. phyllanthina* Syd. de ciruelo europeo (*P. domestica*) en la India (Agarwal *et al.*, 1992), *A. prunicola* Damm & Crous de nectarina en Sudáfrica (Damm *et al.*, 2007b) y *A. pruni* McAlpine de albaricoquero en Australia (McAlpine, 1902).

Frecuentemente, también se encuentran hongos de la familia Diatrypaceae en madera de árboles del género *Prunus* muertos o con decaimiento. En este sentido, *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*) se ha identificado con frecuencia como la causa de decaimiento de almendros (Carter, 1982), albaricoqueros (Carter, 1957), cerezo de Virginia (*P. virginiana*) (English y Davis

1965), ciruelo japonés (Carter, 1982) y cerezo (Munkwold y Marois, 1994). García-Benavides *et al.* (2013) encontraron *E. lata* en *P. cerasifera var. pissardii* en la región de La Rioja (España). En varios países también se ha aislado *Eutypella prunastri* (Pers.) Sacc. de almendros, endrinos (*P. spinosa* L.), cerezos y ciruelos japoneses (Grove, 1935; Ellis y Ellis, 1997). Dam *et al.* (2009) encontraron *Cryptovalsa ampelina* (Nitschke) Fuckelen en varios frutales en Sudáfrica y Trouillas *et al.* (2010a) también encontraron esta especie en albaricoqueros en California, juntamente con *Diatrype oregonensis* (Wehm.) Rappaz.

Especies del género *Phaeoacremonium* también han sido asociadas con necrosis en madera de árboles del género *Prunus*. *Phaeoacremonium minimum* (Tul. & C. Tul.) D. Gramaje, L. Mostert & Crous (= *Pm. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) fue citado en *P. pennsylvanica* L. en Canadá (Hausner *et al.*, 1992) y en albaricoquero en Sudáfrica (Mostert *et al.*, 2006). En Túnez se aisló *Pm. parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf. de albaricoqueros con síntomas de decaimiento (Hawksworth *et al.*, 1976), mientras que en Grecia se aisló este mismo hongo en cerezo (Rumbos, 1986). En el estudio realizado por Damm *et al.* (2008b) se aislaron 14 especies de *Phaeoacremonium* procedentes de necrosis de tejidos de madera de albaricoqueros, ciruelos japoneses, nectarinos y melocotoneros en Sudáfrica, incluyendo cinco nuevas especies, *Pm. prunicolum* L. Mostert, Damm & Crous, *Pm. fuscum* L. Mostert, Damm & Crous de ciruelo, *Pm. pallidum* Damm, L. Mostert & Crous, *Pm. africanum* (Damm, L. Mostert & Crous) D. Gramaje, L. Mostert & Crous y *Pm. griseo-olivaceum* (Damm, L. Mostert & Crous) D. Gramaje, L. Mostert & Crous de albaricoquero. En Irán, Arzanlou *et al.* (2013) aislaron *Pm. iranianum* L. Mostert, Gräfenhan, W. Gams & Crous en muestras de madera de manzano y albaricoquero, y *Pm. minimum* en muestras de albaricoquero.

Damm *et al.* (2010) aislaron varias especies del género *Coniochaeta* (anamorfo: *Lecythophora*) a partir de muestras de *Prunus* que presentaban necrosis en madera en Sudáfrica, en concreto las especies aisladas fueron *Ca.*



*velutina* (Fuckel) Cooke en albaricoquero y ciruelo japonés, y las nuevas especies *Ca. africana* Damm & Crous y *Ca. prunicola* Damm & Crous en albaricoquero y ciruelo japonés, respectivamente. Otras citas de este género en *Prunus* son *Ca. ambigua* en ramitas secas de albaricoquero y cerezo, *Ca. calva* en ciruelo y cerezo y *Ca. lignaria* en peral y cerezo en Moldavia (Popushoi, 1971) y en cerezo en los Países Bajos (CBS 178.75). Damm *et al.* (2010) también propusieron el nuevo género *Collophora* para varios hongos con fase conídica similar a *Lecythophora*, comprendiendo cinco especies que aparecen con frecuencia en melocotoneros y nectarinos con necrosis de la madera en Sudáfrica, en concreto son *C. africana* Damm & Crous, *C. capensis* Damm & Crous, *C. paarla* Damm & Crous, *C. rubra* Damm & Crous, que también fue encontrada en almendro y *C. pallida* Damm & Crous, también encontrada en España en *P. cerasifera* var. *pissardii* (García-Benavides *et al.*, 2013). Además, estos autores describen cuatro nuevas especies del género *Phaeomoniella* asociadas a necrosis de madera de albaricoquero, melocotonero y ciruelo, estas son *Pa. dura* Damm & Crous, *Pa. effusa* Damm & Crous, *Pa. prunicola* Damm & Crous y *Pa. tardicola* Damm & Crous y citaron por primera vez *Pa. zymoides* Hyang B. Lee, J.Y. Park, Summerb. & H.S. Jung en ciruelo japonés.

Varias especies de otros géneros también se han encontrado en madera de *Prunus* spp. con síntomas de decaimiento. Por ejemplo, dentro del género *Paraconiothyrium* Damm *et al.* (2008c) encontraron *P. brasiliense* Verkley en nectarino, melocotonero y ciruelo japonés, y las nuevas especies, *P. africanum* Damm, Verkley & Crous en melocotonero, y *P. variable* Riccioni, Damm, Verkley & Crous en melocotonero, y en melocotonero y ciruelo japonés, respectivamente.

También a partir de madera necrosada de *Prunus* se han encontrado dos nuevas especies de *Jattaea*, concretamente *J. mookgoponga* Damm & Crous en nectarino y *J. prunicola* Damm & Crous en ciruelo japonés, así como una nueva especie del género *Calosphaeria*, esta es *C. africana* Damm & Crous aislada de albaricoquero (Damm *et al.*, 2008a).

Algunas especies del género *Phomopsis* son patógenos importantes en *Prunus* spp., especialmente en almendro, melocotonero y ciruelo. Ya se ha comentado que *P. amygdali*, causante del chancro de ramillas en el almendro, es una de las enfermedades más preocupantes de este cultivo en Mallorca. Esta enfermedad está ampliamente distribuida por todo el mundo, tanto en almendro como en melocotonero (Tuset y Portilla, 1989). En una reciente prospección en Portugal Diogo *et al.* (2010) encontraron *Diaporthe neotheicola* A.J.L. Phillips & J.M. Santos (anamorfo: *P. theicola* Curzi) en almendros con síntomas de decaimiento. Anteriormente, Smit *et al.* (1996) habían identificado *Diaporthe ambigua* (anamorfo: *P. ambigua*) como causante de chancros en portainjertos de ciruelo japonés en Sudáfrica. Otras especies de *Phomopsis* se han citado en almendro y otros *Prunus* como *P. mali* Roberts, *P. padina* (Sacc.) Dietel, *P. parabolica* Petr., *P. perniciosa* Groove, *P. pruni* (Ellis & Dearn.) Wehm., *P. prunorum* (Cooke) Groove, *P. ribatejana* Sousa da Câmara, and *P. stipata* (Lib.) B. Sutton (Uecker, 1988).

La Tabla 1.5 muestra un listado de todos estos hongos patógenos de la madera aislados en *Prunus* spp. y su distribución mundial.

**Tabla 1.5.** Listado de hongos patógenos de la madera aislados de *Prunus* spp. y su distribución mundial.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b><i>Prunus</i> spp.</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
Botryosphaeriaceae	<i>Aplosporella indica</i> ,	<i>P. domestica</i>	India	Agarwal et al. (1992)
	<i>A. phyllanthina</i>	<i>P. armeniaca</i>	Australia	McAlpine (1902)
	<i>A. pruni</i>	<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007b)
	<i>A. prunicola</i>	<i>P. dulcis</i>	EEUU	Inderbitzin et al. (2010)
	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>P. persica</i>	Distribución mundial	Pusey et al. (1995)
		<i>Prunus</i> spp.	E.E.U.U.	Farr et al. (1989)
	<i>Diplodia africana</i>	<i>P. persica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)
	<i>D. mutila</i>	<i>P. armeniaca</i> , <i>P. persica</i>	Desconocido	Sutton (1980)
		<i>P. persica</i>	Nueva Zelanda	Laundon (1973)
	<i>D. pinea</i>	<i>P. persica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)
	<i>D. rosulata</i>	<i>P. africana</i>	Etiopía	Gure et al. (2005)
	<i>D. roumegueri</i> var.	<i>P. laurocerasus</i>	Francia	Wollenweber y Hockahpfel (1941)
	<i>santonensi</i>	<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)
	<i>D. seriata</i>	<i>P. dulcis</i>	E.E.U.U.	Inderbitzin et al. (2010)
		<i>P. laurocerasus</i>	Italia	Quaglia et al. (2013)
		<i>P. persica</i>	Distribución mundial	Inderbitzin et al. (2010)
		<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a), Slippers et al. (2007)
		<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)
		<i>Prunus</i> spp.	E.E.U.U.	Farr et al. (1989)
	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	<i>P. armeniaca</i> , <i>Prunus</i> spp.	Europa, Norteamérica	Wollenweber (1941)
		<i>P. dulcis</i>	E.E.U.U.	Inderbitzin et al. (2010)
	<i>Lasiodiplodia plurivora</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)
	<i>L. theobromae</i>	<i>P. persica</i>	Distribución mundial	Pusey et al. (1995)
	<i>Prunus</i> spp.	E.E.U.U.	Farr et al. (1989)	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>P. dulcis</i>	E.E.U.U.	Inderbitzin et al. (2010)	
<i>Neofusicoccum australe</i>	<i>P. armeniaca</i> , <i>P. persica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)	
	<i>P. dulcis</i>	Sudáfrica	Slippers et al. (2007)	
	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a), Slippers et al. (2007)	
<i>N. parvum</i>	<i>P. persica</i>	Grecia	Thomidis et al. (2011)	
<i>N. mediterraneum</i> ,	<i>P. dulcis</i>	E.E.U.U.	Inderbitzin et al. (2010)	
<i>N. nonquaesitum</i> ,				
<i>N. parvum</i>	<i>Prunus</i> spp.	E.E.U.U.	Farr et al. (1989)	
<i>N. ribis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)	
<i>N. vitifusiforme</i>	<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i> ,	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)	
<i>Spenceriartinsia viticola</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2007a)	
<i>Sphaeropsis peckii</i>	<i>Prunus</i> spp.	E.E.U.U.	Farr et al. (1989)	

**Tabla 1.5.** Listado de hongos patógenos de la madera aislados de *Prunus* spp. y su distribución mundial (continuación).

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b><i>Prunus</i> spp.</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>	
Calosphaeriaceae	<i>Calosphaeria africana</i>	<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008a)	
	<i>Jattaea mookgoponga</i>	<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008a)	
	<i>J. prunicola</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008a)	
	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta africana</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2010)
<i>Ca. ambigua</i>		<i>P. armeniaca</i> , <i>P. avium</i>	Moldavia	Popushoi (1971)	
<i>Ca. calva</i>		<i>P. avium</i> , <i>P. domestica</i>	Moldavia	Popushoi (1971)	
<i>Ca. lignaria</i>		<i>P. domestica</i>	Moldavia	Popushoi (1971)	
<i>Ca. prunicola</i> , <i>Ca. velutina</i>		<i>P. armeniaca</i> , <i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2010)	
Diaporthaceae		<i>Phomopsis ambigua</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Smit et al. (1996)
	<i>P. amygdali</i>	<i>P. dulcis</i> , <i>P. persica</i>	Distribución mundial	Tusset y Portilla (1989)	
	<i>P. mali</i> , <i>P. padina</i> , <i>P. parabolica</i> , <i>P. pruni</i> , <i>P. permiciosa</i> , <i>P. pruni</i> , <i>P. prunorum</i> , <i>P. stipata</i> , <i>P. ribetjana</i> , <i>P. theicola</i> , <i>Phomopsis</i> sp.	<i>P. dulcis</i> , <i>Prunus</i> spp.	Distribución mundial	Uecker (1988)	
	<i>P. dulcis</i>	<i>P. dulcis</i>	Portugal	Diogo et al. (2010)	
	Diatrypaceae	<i>Cryptovalsa ampelina</i>	<i>P. armeniaca</i>	E.E.U.U.	Trouillas et al. (2010)
		<i>Diatrype oregonensis</i> <i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus</i> spp.	Sudáfrica	Damm et al. (2009)
			<i>P. armeniaca</i>	E.E.U.U.	Trouillas et al. (2010)
		<i>Etyella prunastri</i>	<i>P. avium</i>	Distribución mundial	Munkvold y Marois (1994)
			<i>P. armeniaca</i>	Distribución mundial	Carter (1957)
			<i>P. dulcis</i> , <i>P. salicina</i>	Distribución mundial	Carter (1982) Rumbos (1985)
<i>P. virginiana</i>			Distribución mundial	English y Davis (1965)	
<i>P. cerasifera</i> var. <i>pissardii</i>			España	García Benavides et al. (2013)	
<i>P. avium</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. salicina</i> , <i>P. spinosa</i>			Distribución mundial	Groove (1935), Ellis y Ellis (1997)	
Herpotrichiellaceae		<i>Phaeomoniella dura</i> , <i>Pa. effusa</i> , <i>Pa. prunicola</i> , <i>Pa. zymoides</i>	<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2010)
	<i>Pa. tardicola</i>	<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2010)	
	<i>Paraconiothyrium africanum</i>	<i>P. persica</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008c)	
<i>Pc. brasilense</i>		<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i> , <i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008c)	
		<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al. (2008c)	

**Tabla 1.5.** Listado de hongos patógenos de la madera aislados de *Prunus* spp. y su distribución mundial (continuación).

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b><i>Prunus</i> spp.</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
Togniniaceae	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Mostert et al.(2003, 2006), Damm et al.(2008c)
		<i>P. armeniaca</i>	Irán	Arzanlou et al.(2013)
		<i>P. pennsylvanica</i>	Canadá	Hausner et al.(1992)
		<i>P. persica, P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. avium</i>	Grecia	Rumbos (1986)
		<i>P. armeniaca</i>	Túnez	Hawksworth et al.(1976)
		<i>P. armeniaca</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. armeniaca, P. persica, P. persica var. nucipersica, P. salicina</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. persica, P. persica var. nucipersica</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. dulcis, P. persica, P. persica var. nucipersica, Prunus cerasifera var. pissardii</i>	Sudáfrica	Damm et al.(2008b)
		<i>P. persica, P. persica var. nucipersica</i>	España	García Benavides et al.(2013)
	Desconocida	<i>Collophora africana,</i> <i>C. capensis, C. paaria,</i> <i>C. pallida</i>		
<i>C. rubra</i>				
<i>C. pallida</i>				

#### **I.4. LA SECA Y MUERTE DE ALMENDROS EN MALLORCA.**

Desde el año 2008, se observan en Mallorca árboles con síntomas que recuerdan en gran medida a los que han descrito diferentes autores en otras regiones del mundo causados por hongos patógenos de la madera. Éstos son decaimiento y brotaciones deficientes, hojas cloróticas, marchitez generalizada y muerte de ramas e incluso de árboles enteros. Asociados a estos síntomas externos, también se observan síntomas internos, en la madera, tales como necrosis sectoriales, punteaduras y anillos oscuros en la zona vascular o madera esponjosa.

Esta problemática se está estudiando desde entonces en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca y es el objeto de la presente Tesis Doctoral.

## II. Objetivos

---





## II. OBJETIVOS

---

En esta Tesis se pretende estudiar la etiología y el control del decaimiento de ramas y muerte de almendros que se ha venido observando en zonas de cultivo de la isla de Mallorca desde el año 2008. Para abordar este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la sintomatología del decaimiento y muerte de ramas de almendro en diferentes zonas de cultivo en la isla de Mallorca.
2. Aislar los hongos asociados a los síntomas observados e identificarlos mediante técnicas morfológicas y moleculares.
3. Comprobar la patogenicidad de hongos pertenecientes a las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en diferentes variedades de almendro.
4. Comprobar la patogenicidad a almendro de las especies *Collophora hispanica*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum* y *Pleurostomophora richardsiae*.
5. Evaluar la efectividad *in vitro* de diferentes materias activas fungicidas para el control de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae.
6. Evaluar la efectividad de los fungicidas más efectivos entre los ensayados *in vitro* en la protección de heridas de poda frente a la infección por hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae.



### **III.** Hongos asociados a la seca de ramas y muerte de almendros en la isla de Mallorca

---



# III. HONGOS ASOCIADOS A LA SECA DE RAMAS Y MUERTE DE ALMENDROS EN LA ISLA DE MALLORCA

---

Ante la problemática de la marchitez y seca de ramas de almendros que se estaba observando en algunas zonas de la isla de Mallorca desde el año 2008, se decidió realizar prospecciones regulares de parcelas de cultivo de almendro con presencia de árboles afectados localizadas en diferentes zonas de la isla para caracterizar los síntomas y determinar las especies fúngicas asociadas.

## **III.1. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### III.1.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE HONGOS.

Las prospecciones se realizaron durante seis años consecutivos, entre 2009 y 2014, en primavera o inicios del verano, en el momento en el que los síntomas de decaimiento de los árboles se observaban con mayor facilidad. En total se prospectaron 33 parcelas, distribuidas por las principales zonas de cultivo de almendro en Mallorca (comarcas de Es Raiguer, Pla, Llevant, y Migjorn), en las que se tomaron varias muestras en cada una de las 57 ocasiones en las que se visitaron algunas de las parcelas. En estas prospecciones se incluyó también una parcela de albaricoqueros que se encontraba junto a una de las parcelas muestreadas y muestras de almendro de una parcela localizada en la isla de Ibiza en la que se tomaron muestras en el año 2014. Dado que el foco inicial de la problemática se situaba en parcelas de

la población de Son Carrió (Sant Llorenç des Cardassar), la presión de los muestreos fue superior en esa zona, visitándose más parcelas durante el período de estudio e incluyendo algunas de esas parcelas en cada prospección anual. La Tabla 3.1 muestra la localización de las parcelas muestreadas, las variedades de almendro cultivadas y la edad aproximada de los árboles, así como los años en que se realizaron las visitas y el número total de muestreos realizados en cada una de ellas.

En las parcelas se seleccionaron árboles con síntomas de decaimiento, marchitez y seca de ramas, y se procedió a cortar alguna de esas ramas. Se evitó tomar muestras de ramas sin presencia de brotaciones con hojas, pues esto sería un indicio de que esa rama no había brotado ese año. El decaimiento y seca de la rama en esos casos se habría producido al menos de un ciclo vegetativo anterior y la probabilidad de éxito en los aislamientos hubiera disminuido ya que podrían coexistir hongos saprofitos junto a los posibles patógenos. En cada parcela y momento de muestreo se recogieron ramas de al menos 3-5 árboles sintomáticos.

**Tabla 3.1.** Localización de las parcelas muestreadas, variedades principales, edad aproximada de los árboles, número de muestreos y años en los que se realizaron.

Parcela	Coordenadas (Huso 31S)		Municipio	Comarca	Cultivo	Variedades principales	Edad de los árboles (años)	Nº muestreos	Años en los que se muestreó
	X (m)	Y (m)							
1	5305569	4383192	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	10 a 60	8	2009, 2010, 2011, 2012
2	529373	4382034	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	10 a 60	6	2009, 2010, 2011, 2012
3	529366	4382035	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	60	2	2009, 2010
4	529809	4384072	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet /Vivot/ Cristomorto /Jordi	30	2	2009, 2010
5	529975	4381430	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	40	3	2009, 2012, 2013
6	528734	4380950	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Ferragnes /Ferranduel/Guara	15 a 20	3	2009, 2012, 2013
7	529518	4381862	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	50	1	2009
8	530275	4382654	Sant Llorenç des Cardassar	Llevant	Almendra	Totsollet/Pons/Vivot/ Bord d'en Bessó/Jordi	50	3	2010, 2011, 2013
9	488690	4385126	Sencelles	Pla	Almendra	-	-	1	2010
10	532430	4385113	Son Severa	Llevant	Almendra	-	-	1	2010
11	523470	4379286	Manacor	Llevant	Almendra	-	70-80	2	2010
12	481170	4391341	Santa María	Raiguer	Almendra	Vivot / Guarín	25 a 30	2	2011, 2012
13	481092	4391354	Santa María	Raiguer	Almendra	Vivot / Guarín	25 a 30	2	2011, 2012
14	481371	4391060	Santa María	Raiguer	Almendra	-	-	1	2012
15	482972	4389000	Santa María	Raiguer	Almendra	Vinagrillos	25 a 30	1	2012
16	484370	4369955	Llucmajor	Migjorn	Almendra	Poteta	80	1	2011
17	496130	4368334	Llucmajor	Migjorn	Almendra	Menor/Jordi/Verdereta /Pont d'Inca	70 a 80	1	2011

**Tabla 3.1.** Localización de las parcelas muestreadas, variedades principales, edad aproximada de los árboles, número de muestreos y años en los que se realizaron (continuación).

Parcela	Coordenadas (Huso 31S)		Municipio	Comarca	Cultivo	Variedades principales	Edad de los árboles (años)	Nº muestreos	Años en los que muestreó
	X (m)	Y (m)							
18	492148	4373879	Llucmajor	Migjorn	Almendro			1	2011
19	480052	4389610	Santa María	Raiguer	Almendro	Vivot / Guarín	40	1	2011
20	488461	4393910	Binissalem	Raiguer	Albaricoquero	-	20 a 25	2	2011, 2012
21	498654	4383611	Sant Joan	Pla	Almendro	Pons	40-50	1	2012
22	484085	4389271	Consell	Raiguer	Almendro	Vivot / Ribes	25	1	2012
23	523773	4380828	Manacor	Llevant	Almendro	Masbovera/Ferragnes/ Glorieta	20	1	2013
24	527287	4378611	Manacor	Llevant	Almendro	-	-	1	2013
25	478222	4390202	Santa María	Raiguer	Almendro	Vivot	25-50	1	2013
26	489563	4391193	Binissalem	Raiguer	Almendro	Garrigues	10-12	1	2013
27	487402	4394389	Binissalem	Raiguer	Almendro	Vivot / Guarín	30-50	1	2013
28	489850	4385740	Sencelles	Pla	Almendro	-	-	1	2013
29	485638	4370980	Llucmajor	Migjorn	Almendro			1	2013
30	490503	4369947	Llucmajor	Migjorn	Almendro			1	2014
31	487318	4369242	Llucmajor	Migjorn	Almendro			1	2014
32	482968	4371518	Llucmajor	Migjorn	Almendro			1	2014
33	361964	4322207	Sant Antoni De Portmany	S. Antoni Abad (Ibiza)	Almendro			1	2014



Para los cortes de las ramas elegidas se utilizó tijera de poda, sierra o motosierra, dependiendo del grosor de la rama. En unas ocasiones se observaba directamente en los cortes más gruesos la presencia de necrosis en madera, otras veces se seguía troceando la muestra y los síntomas se observaban en diámetros menores. Las muestras, debidamente identificadas, se guardaban en bolsas de plástico para su posterior traslado al laboratorio.

En el laboratorio las muestras se descortezaron y se trocearon en fragmentos más pequeños que se desinfectaron en superficie mediante pulverización con etanol y posterior flameado. En una cámara de flujo laminar se procedió a sembrar algunos de esos fragmentos en medio de cultivo Agar Extracto de Malta 3,3 % (MEA; Conda-Pronadisa, Madrid, España) con la adición de 0,5 g/l de sulfato de estreptomina (MEAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las placas se mantuvieron entre 14 y 21 días a 25 °C en oscuridad. Cada 24-48 horas se comprobaron las placas de aislamiento, repicando las colonias fúngicas en crecimiento a una placa con medio Patata Dextrosa Agar 3,9 % (PDA; Conda-Pronadisa, Madrid, España).

### III.1.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.

Las colonias fúngicas obtenidas se incubaron durante 15-21 días a 25 °C en oscuridad para favorecer el crecimiento y esporulación. Posteriormente, se realizaron preparaciones microscópicas para el reconocimiento inicial de colonias pertenecientes a hongos saprofitos, mayoritariamente de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*, que fueron descartados y la selección de colonias en las que se realizaba una primera identificación tentativa como hongos pertenecientes a las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae, al género *Phaeoacremonium* y algunos otros hongos, incluidos basidiomicetos. Con estas colonias se realizó un estudio de identificación más específico, a partir de cultivos monoconídicos o procedentes de puntas de hifa.

Las especies de Botryosphaeriaceae se identificaron tentativamente según la morfología de sus colonias y conidios, siguiendo las descripciones de Phillips (2006) y Phillips *et al.* (2013). Para favorecer la esporulación de los aislados, éstos se repicaron a placas de medio agar agua 2% (AA; Conda-Pronadisa, Madrid, España), en las que se colocaron acículas de pino estériles. Estas placas se incubaron durante al menos un mes a 25 °C con fotoperíodo de 12 horas oscuridad / 12 horas UV cercano (Narva Blacklight Blue LT 30/W073) (Slippers *et al.*, 2004). Las placas se revisaban semanalmente para observar la presencia de picnidios con formación de conidios; en dicho caso, se observaban al microscopio su forma, tamaño, color, presencia o ausencia de septos y estructura de la pared.

En el caso de las especies de Diatrypaceae, la identificación basada en aspectos morfológicos del anamorfo *Libertella* es complicada (Glawe y Rogers, 1984). Para favorecer su esporulación las placas se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo anteriormente descritas para las especies de Botryosphaeriaceae, o según lo descrito por Luque *et al.* (2012). A medida que los aislados esporulaban, los conidios se montaron en agua para su observación microscópica. De esta manera se pudo comparar la morfología de las colonias y conidios con estudios previos a fin de intentar identificar la especie (Trouillas *et al.*, 2010a, 2011; Luque *et al.*, 2012).

Para la identificación de especies de *Phaeoacremonium* se observaron varias características morfológicas tales como el tamaño y forma de los conidióforos, las fiálides, los cordones miceliares y los conidios. También se observó la producción de pigmentos de los hongos en los medios de cultivo PDA, MEA o Agar avena (OA; 60 g harina de avena, 12,5 g de agar), tras incubación de los mismos a 25 °C, observándolos a los 8 y 16 días (Mostert *et al.*, 2006).

Para la identificación morfológica de las especies de *Collophora* se favoreció la esporulación de los aislados repicando las colonias fúngicas en medio pobre en nutrientes, Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA; Nirenberg, 1976), con acículas de pino estériles, manteniendo dichos cultivos a 24 °C en

oscuridad y realizando las observaciones de los caracteres morfológicos a las 2 y a las 4 semanas. Así, se pudo observar la forma y tamaño de los conidios y conidióforos (Damm *et al.*, 2010). Los caracteres de la colonia y la producción de pigmentos se observaron en PDA, MEA y OA a las 2 semanas de incubación a 24 °C (Crous *et al.*, 2009).

Frecuentemente se obtuvieron aislados, similares entre ellos, no pertenecientes a los grupos anteriores. Estos aislados, mantenidos en medio de cultivo PDA, se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 15 días tras los cuales se observaron sus características morfológicas. Estas características incluían la presencia de fálides esbeltas subcilíndricas con collaretes cortos y dos tipos de conidias, unas marrones subglobosas y otras hialinas con forma entre alantoides y cilíndricas, que coinciden con las descritas para *Pleurostomophora richardsiae* (Nannf.) L. Mostert, W. Gams & Crous (Vijaykrishna *et al.*, 2004).

Además, algunos aislados, tras ser incubados en medio de cultivo PDA a 25 °C en oscuridad durante 15 días, presentaron aspectos morfológicos característicos de los Basidiomicetos en medio de cultivo tales como micelio estéril, presencia de fíbulas y doliporos.

### III.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.

La identificación morfológica se completó con la identificación molecular mediante la secuenciación de determinados fragmentos de ADN. Previamente, se obtuvieron cultivos monoconídicos o procedentes de puntas de hifa de todos los aislados seleccionados.

Para la extracción del ADN genómico total se utilizó el kit EZNA Plant Miniprep Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.) con muestras de micelio de los hongos a identificar, cultivados durante dos semanas en oscuridad en medio PDA y triturando en mortero con ayuda de nitrógeno líquido.

Para las especies de basidiomicetos, Diatrypaceae, *Collophora* y *Pleurostomophora*, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosómico. En el caso de las especies de *Phaeoacremonium* se amplificó una región del gen de la  $\beta$ -tubulina (BT) y para las especies de Botryosphaeriaceae se amplificó la región ITS además de una parte del gen del factor de elongación 1- $\alpha$  (FE1-  $\alpha$ ). En todos los casos se usó un programa de PCR de 3 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 45 segundos a 72 °C, finalizando con una extensión a 72 °C durante 1 minuto. En la Tabla 3.2 se muestran los cebadores universales utilizados para cada PCR y las referencias bibliográficas correspondientes.

**Tabla 3.2.** Regiones secuenciadas y cebadores utilizados para la identificación molecular de cada familia o género de hongos aislados.

Familia o género	Región secuenciada	Cebadores	Fuente
Basidiomicetos, Diatrypaceae, <i>Collophora</i> , <i>Pleurostomophora</i>	ITS	<b>ITS1F</b> : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA <b>ITS4</b> : TCCTCCGCTTATTGATATGC	Gardes y Bruns (1993) White <i>et al.</i> (1990)
<i>Phaeoacremonium</i>	$\beta$ -tubulina	<b>T1</b> : ACATGCGTGAGATTGTAAGT <b>BT2b</b> : ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	O 'Donnell y Cigelnik (1997) Glass y Donaldson (1995)
Botryosphaeriaceae	ITS	<b>ITS1F</b> : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA <b>ITS4</b> : TCCTCCGCTTATTGATATGC	Gardes y Bruns (1993) White <i>et al.</i> (1990)
	Factor de elongación 1- $\alpha$	<b>EF1F</b> : TGCGGTGGTATCGACAAGCGT <b>EF2R</b> : AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG	Jacobs <i>et al.</i> (2004)

Los productos de amplificación se secuenciaron con un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA., EE. UU.). En el caso de los hongos del género *Phaeoacremonium*, las secuencias se compararon mediante sistema de identificación de especies de este género disponible en línea (<http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium/biolomics.aspx>), desarrollado por Mostert *et al.* (2006). Para el resto de hongos, las secuencias obtenidas se compararon con las presentes en el GenBank mediante la herramienta bioinformática BLAST (NCBI, Bethesda, MD., EE. UU.) en un primer paso para la

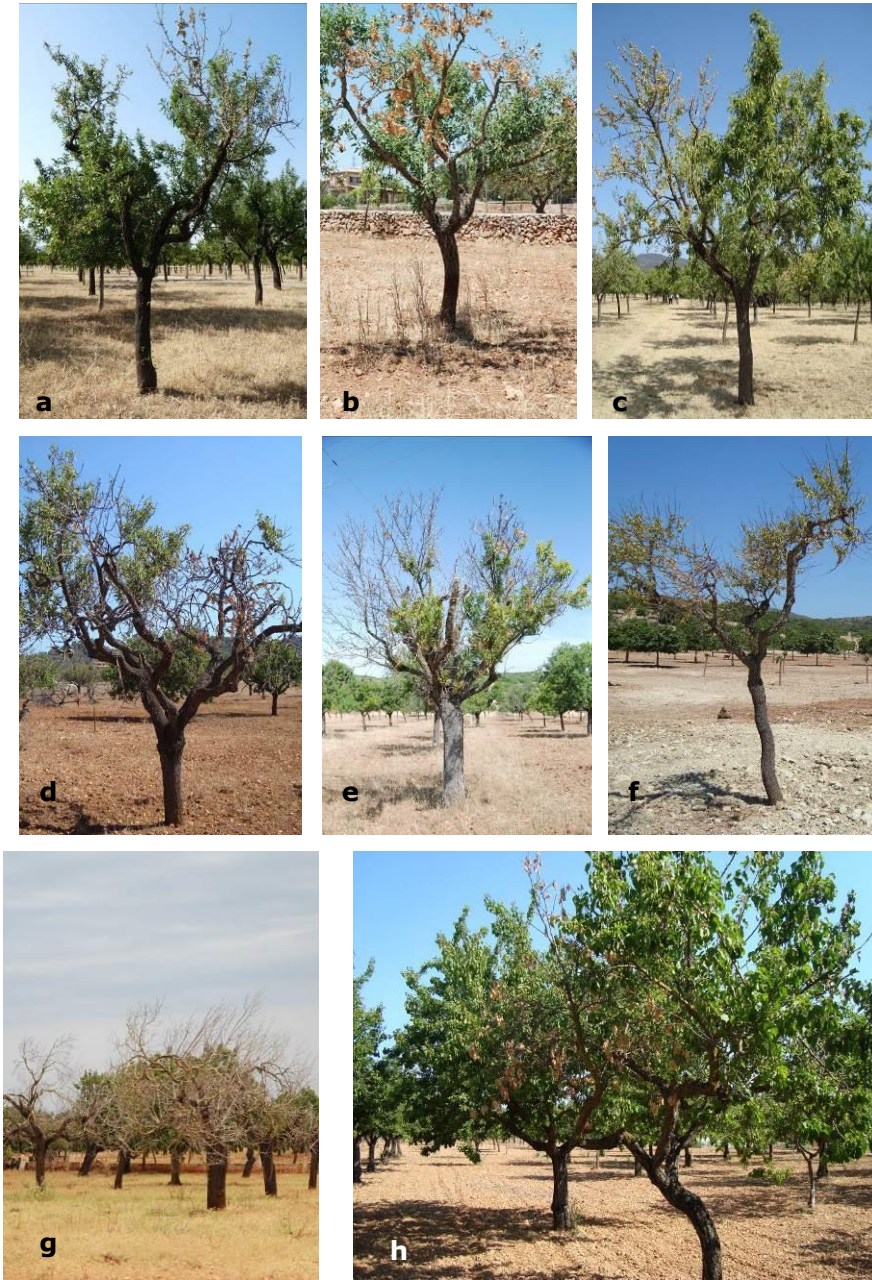
identificación de las muestras. Para la comprobación de dichos resultados y la identificación definitiva de las muestras, las secuencias se alinearon con secuencias de referencia utilizando el programa CLUSTAL W (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, Reino Unido) y se realizó un análisis filogenético mediante el método Neighbour Joining utilizando el modelo Kimura 2 parámetros. Tanto el alineamiento como el análisis filogenético se realizaron con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

## **III.2. RESULTADOS.**

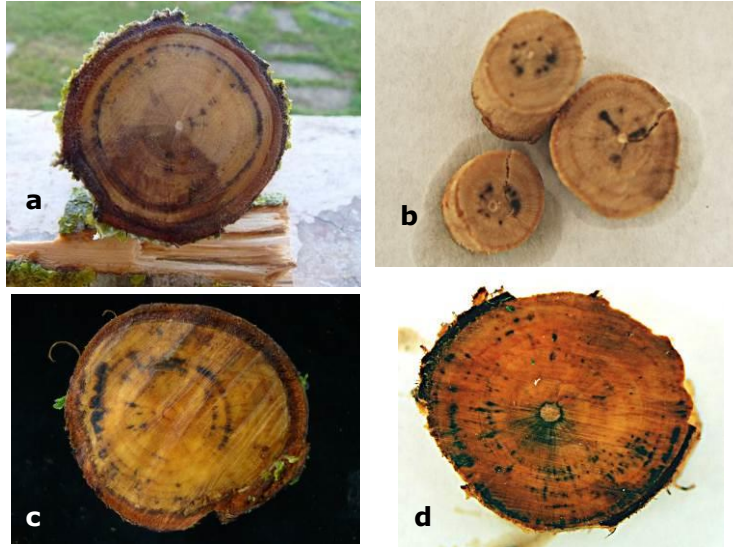
### III.2.1. CARACTERIZACIÓN DE SÍNTOMAS.

Al observar en detalle los síntomas externos de los árboles afectados, éstos comprendían: clorosis de hojas, seca de brotes y yemas, decaimiento, marchitez, y colapso de ramas (Figura 3.1). Algunos de los árboles morían a las pocas semanas de haberse observado los primeros síntomas. En otros casos, la muerte de los árboles era más progresiva y se observaba en muestreos en años sucesivos.

En cortes transversales de las ramas de las muestras analizadas en laboratorio se apreciaban puntos necróticos, en ocasiones formando anillos o semicírculos, y otras veces distribuidos de manera aislada (Figura 3.2). En otras muestras se observaban zonas necróticas más amplias ocupando un sector del corte, con bordes bien definidos, en forma de cuña (Figura 3.3), o bien necrosis con bordes más irregulares y, generalmente, ocupando más superficie (Figura 3.4). En algunas ocasiones, de manera aislada o bien en presencia de otros síntomas, también se observaron zonas de tejido descompuesto y consistencia más blanda o esponjosa (Figura 3.5).



**Figura 3.1.** Síntomas externos de clorosis de hojas, seca de brotes, decaimiento, marchitez, colapso de ramas y muerte de árboles, asociados a hongos patógenos de la madera en almendro (a-g) y albaricoquero (h). Las imágenes corresponden a árboles situados en las parcelas 1 (e, f y g), 2 (d), 5 (b), 12 (a), 13 (c) y 20 (h).

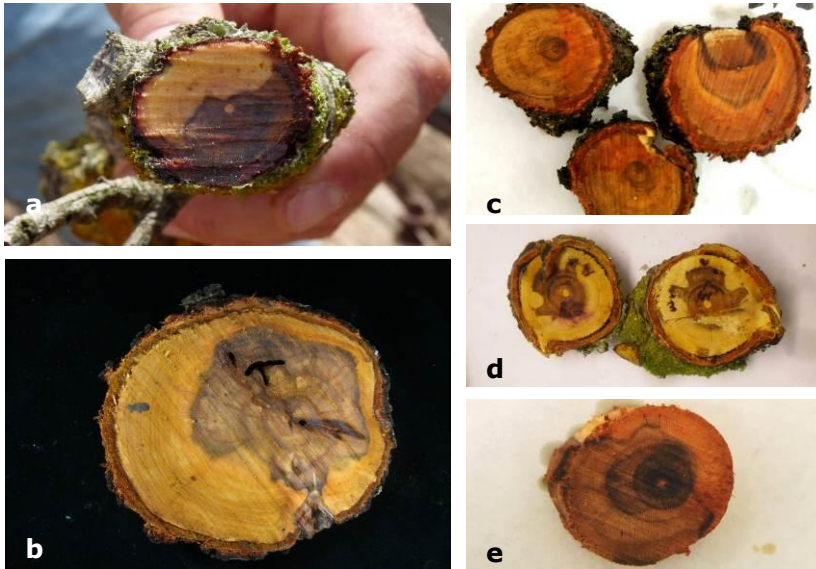


**Figura 3.2.** Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro. Se observan puntos necróticos formando anillos o un semicírculos (a, c, d), pequeñas zonas o puntos necróticos aislados (b). Los hongos aislados en las muestras de la figura fueron a: *Neofusicoccum luteum*, b: *N. mediterraneum*, c,d: *Collophora hispanica*.

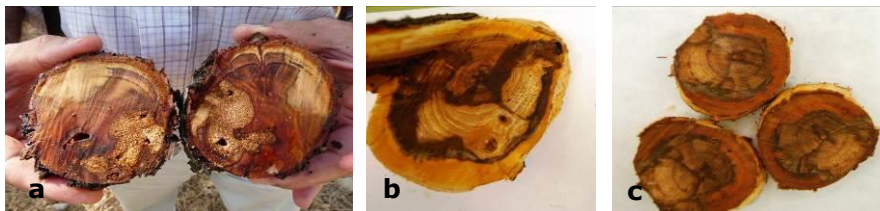


**Figura 3.3.** Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro en las que se observan necrosis sectoriales de márgenes bien definidos, en cuña. Los hongos aislados en las muestras de la figura fueron en a: *Diplodia seriata*, b-c: *Neofusicoccum parvum*, d: *Diplodia olivarum*, e: *N. parvum*, *D. olivarum* y *Eutypa leptoplaca*, f: *Pleurostomophora richardsiae*.





**Figura 3.4.** Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro (a-d) y albaricoquero (e) en las que se observan necrosis sectoriales de márgenes irregulares, ocupando en ocasiones una amplia superficie del corte. Los hongos aislados en las muestras de la figura fueron en a: *Neofusicoccum parvum*, b: *Collophora hispanica*, c: *Eutypa leptoplaca*, d: *Phaeoacremonium minimum* y *Pleurostomophora richardsiae*, e: *Phaeoacremonium venezuelense*.



**Figura 3.5.** Síntomas de enfermedades de la madera en cortes transversales de ramas de almendro en las que se observan tejidos descompuestos de consistencia esponjosa y galerías de insectos (a y b). Los hongos aislados en las muestras de la figura fueron en a: *Phellinus pomaceus*, b: *Phellinus pomaceus* y *Pleurostomophora richardsiae*, c: *Fomitiporia mediterranea*.



### III.2.2. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y SU DISTRIBUCIÓN.

Se identificaron un total de 14 especies de hongos asociados a las muestras de almendro analizadas. Éstas fueron: *Collophora hispanica* Gramaje, Armengol & Damm, *Diplodia olivarum* A.J.L. Phillips, Frisullo & Lazzizzera, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca* (Durieu & Mont.) Rappaz, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius* sensu auct., *Phaeoacremonium amygdalinum* Gramaje, Armengol & Mostert, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus* (Pers.) Maire. y *Pleurostomophora richardsiae*. En las muestras de albaricoquero (parcela 20), se aislaron *N. parvum*, *D. seriata* y *P. richardsiae*, que se encontraron también en muestras de almendro, y las especies *Pm. minimum* y *Pm. venezuelense* L. Mostert, Summerb & Crous, que se detectaron solamente en este cultivo.

*Collophora hispanica* y *Pm. amygdalinum* son dos nuevas especies que se describieron a partir de aislados recogidos en las prospecciones de esta Tesis Doctoral (Gramaje *et al.*, 2012). No obstante, como los trabajos taxonómicos relacionados con la descripción de estas especies no se incluyen en la parte experimental de esta Tesis, a continuación se presentan únicamente las características morfológicas de cada uno de estos hongos:

***Collophora hispanica*** (Fig. 3.6): Las hifas son hialinas y con pared lisa, tabicadas, ramificadas, de 1 a 3,5  $\mu\text{m}$  de ancho y carentes de clamidosporas. La esporulación es abundante, la formación de conidias se produce en adelofiálides, ocasionalmente en hifas (endoconidias) y en conidiomas o mediante conidiogénesis microcíclica. Las células conidiogénicas son enteroblásticas, hialinas, generalmente intercalares, reducidas a collaretos formados directamente en las células hifales o en cuellos cortos (cilíndricos, de 0,5-2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de anchura). A menudo se observan fiálides separadas, entre cilíndricas y ampuliformes de 4,5-8 x 1-2  $\mu\text{m}$ ; los collaretos tienen una forma entre cilíndrica y de embudo estrecho, tienen 0,5  $\mu\text{m}$  de longitud, pared muy fina y una apertura de 0,5  $\mu\text{m}$ , a veces se observa un engrosamiento periclinal poco marcado. Las conidias se agregan en masas

alrededor de las hifas, son hialinas, unicelulares, cilíndricas, en ocasiones obovadas, de paredes lisas, a menudo ligeramente curvadas, con los extremos obtusos o con un ápice papilado, sus medidas son las siguientes:  $(2,5-3,5-5(-6,5) \times (1-1,5(-2) \mu\text{m}$ ,  $\bar{X} \pm \sigma = 4,3 \pm 0,7 \times 1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , ratio longitud/anchura = 2,8. Después de cuatro semanas se observan abundantes conidias aclavadas, limoniformes, subesféricas o irregularmente hinchadas, a menudo  $> 2 \mu\text{m}$ .

En ocasiones se produce conidiogénesis secundaria con conidias que se desarrollan a partir de otras conidias, llegando a ser de más de  $7 \mu\text{m}$  de longitud y  $2-3 \mu\text{m}$  de ancho, a veces tabicadas, con un cuello corto o con una mera apertura con un collarite minúsculo en uno de los extremos. Las endoconidias son uniseriadas, hialinas, unicelulares, ligeramente curvadas, con los dos extremos obtusos, y tienen el mismo tamaño que las conidias de las células hifales.

Ocasionalmente, se pueden formar conidiomas en acículas de pino a las 2-4 semanas. En ese caso los conidióforos son entre hialinos y ligeramente rojizos, de pared lisa, tabicados y ramificados. Las células conidiogénicas son enteroblásticas, entre hialinas y ligeramente rojizas, de pared fina y con forma entre cilíndrica y ampuliforme. La conidiogénesis se produce en posición terminal e intercalar justo debajo del septo. La célula conidiogénica tiene un tamaño de  $3-6 \times 1-3 \mu\text{m}$ , en ocasiones se observan collarites de  $\leq 0,5 \mu\text{m}$  de longitud con una apertura de  $\leq 0,5 \mu\text{m}$  de ancho en los que no se observa engrosamiento periclinal. Las conidias son hialinas o rojizas, unicelulares, cilíndricas, a veces obovadas, ligeramente curvadas, de pared lisa, con ambos extremos obtusos o con un ápice papilado. Sus medidas son las siguientes:  $(2,5-3-5(-7) \times 1-2(3,5) \mu\text{m}$ ,  $\bar{X} \pm \sigma = 4,2 \pm 1 \times 1,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , ratio longitud/anchura = 2,5.

Características del cultivo: Las colonias alcanzan en medio de cultivo MEA un radio de 2-2,5 mm a las dos semanas a  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad. La temperatura mínima de crecimiento es  $<6 \text{ }^\circ\text{C}$ , el óptimo es de  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  y el máximo de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . En medio de cultivo PDA las colonias son planas, húmedas,

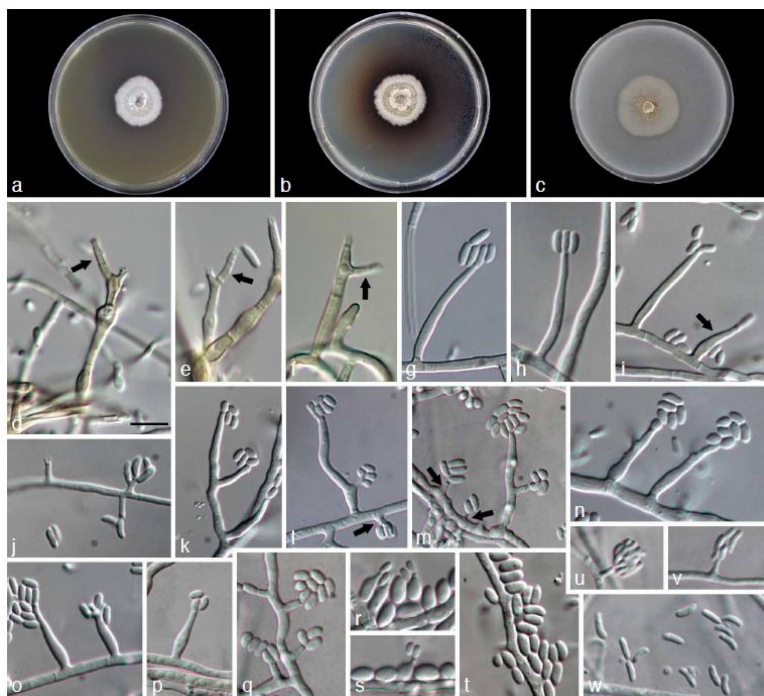
con margen entre liso y ondulado, de color entre rojo pálido y vino tinto con márgenes entre blanco y color vino pálido. El micelio aéreo también es de color vino pálido, más intenso en el centro de la colonia. El reverso muestra los mismos colores, volviéndose de color vino más oscuro con el tiempo. El medio de cultivo se tiñe también de color vino. En medio OA la colonia es entre plana y ligeramente convexa, con margen entre liso y ligeramente ondulado, de color blanco a rosado pálido, con la superficie casi totalmente cubierta por micelio aéreo de color blanco. Por el reverso el color es entre salmón y color carne, blanco hacia los márgenes. En MEA, la colonia es ligeramente convexa, de margen ondulado, de color vino oscuro, con la superficie cubierta parcial o totalmente con micelio aéreo de color entre rosado y color vino, el reverso es de color sangre y el medio se tiñe de rojo alrededor de la colonia.



**Figura 3.6.** Características morfológicas de *Collophora hispanica*. a) Colonia en MEA, donde se puede observar la tinción de color rojo del medio debido al pigmento exudado por el hongo; b) conidioma en acícula de pino; c-h) células conidiogénicas y conidias en células hifales; i, j) conidióforos formados en el conidioma; k, l) conidiación microcíclica (indicada por flechas) en conidias de conidioma (k) y de células hifales (l); m) conidias formadas en conidiomas después de 4 semanas; n, o) endoconidios; p, q) conidias formadas en células hifales después de 4 semanas; r) conidias formadas en células hifales después de 2 semanas; Barras de escala: a)=1 mm; b)=100  $\mu$ m; c)=5  $\mu$ m; la barra de c se puede aplicar todas las imágenes de c) a r).

***Phaeoacremonium amygdalinum*** (Fig. 3.7): Las estructuras aéreas observadas en medio de cultivo MEA consisten en un micelio con hifas ramificadas y tabicadas que pueden aparecer aisladas o formando cordones miceliarios de hasta 10 hifas. Las hifas pueden ser entre verrugosas y lisas, de color marrón a marrón pálido y de 2-3,5  $\mu\text{m}$  de anchura. Los conidióforos son en su mayoría cortos y no ramificados, se originan tanto en hifas aéreas como en sumergidas, son entre erectos y flexuosos y tienen hasta 5 septos. Su color va desde marrón pálido a marrón y son verrugosos en la base. Miden (12-)15,5-40(-55) ( $\bar{X}$  = 29)  $\mu\text{m}$  de largo y 1,5-3 ( $\bar{X}$  = 2,1)  $\mu\text{m}$  de ancho. Las fiálides son terminales o laterales, a menudo polifiálidicas, son entre lisas y verrugosas, hialinas y con collaretes de 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  de largo y 1-1,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Existen 3 tipos de fiálides, las de tipo I son en su mayoría cilíndricas, ocasionalmente con la base ensanchada y miden (3-)3,5-7,5(-10)  $\times$  1-2 ( $\bar{X}$  = 6  $\times$  1,5)  $\mu\text{m}$ . Las fiálides de tipo II predominan más, pueden ser cilíndricas o naviculares, algunas son elongadas-ampuliformes y atenuadas en la base, miden (9-)10-16,5(-17)  $\times$  1,5-2,5 ( $\bar{X}$  = 13,5  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ . Las de tipo III son entre cilíndricas y subcilíndricas, miden 7-27  $\times$  1,5-2,5(-3) ( $\bar{X}$  = 21  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ . Las conidias son hialinas, oblongas, elipsoidales o obovoides, miden (3-)4-5  $\times$  1,5-3 ( $\bar{X}$  = 4,5  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ , ratio longitud/anchura = 2,1.

Características del cultivo: Las colonias alcanzan un radio de 9,5-10 mm después de 8 días de incubación a 25 °C. La temperatura mínima de crecimiento es de 15 °C, el óptimo de 25 °C, y el máximo de 30-35 °C. Las colonias en medio de cultivo MEA son planas con márgenes lisos, al observarlas después de 8 y 16 días, son entre blancas y pardo grisáceo en la parte superior y entre amarillo brillante y color verde oliva amarillento por el reverso. En medio de cultivo PDA las colonias son planas, de aspecto afieltrado, con mechones cerca del centro, con márgenes de la colonia lisos; después de 8 y 16 días, son entre marrón y verde oliva en la parte de arriba y de color entre pardo-grisáceo pálido y marrón grisáceo por el reverso. En medio OA las colonias son también planas con márgenes lisos, de color entre blanco y verde oliva grisáceo en la parte de arriba. Las colonias de este hongo producen pigmentación marrón pálido en medio PDA.



**Figura 3.7.** Características morfológicas de *Phaeoacremonium amygdalinum*. a - c) Colonias con 16 días de crecimiento en MEA (a), PDA (b) y OA (c); d-j) estructuras aéreas en MEA; d-f) conidióforos con polifiálides (señaladas con flechas); g,h) fiálides tipo III; i) fiálide tipo III y fiálide tipo II (señalada con flecha); j) fiálides tipo I; k-t) estructuras aéreas usando la técnica del cultivo en portaobjetos; k-m) conidióforos ramificados y fiálides tipo I (señaladas con flechas); n-p) fiálides tipo II; q) fiálides tipo I; r-s) conidiación microcíclica; t) conidias; u-v) adelofiálides con conidias; w) conidias. Barra de escala: d = 10  $\mu$ m, se puede aplicar a todas las imágenes desde d) a w).

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de los hongos aislados en cada una de las visitas a las parcelas durante los 6 años que duraron las prospecciones, mientras que la Tabla 3.4 aglutina dichas fechas para mostrar sólo las especies aisladas durante los 6 años de prospecciones. Finalmente, la Tabla 3.5 muestra las especies aisladas y el número de parcelas y comarcas en las que éstas se encontraron, mientras que las Figuras 3.7 y 3.8 muestran los mismos datos en porcentajes.

**Tabla 3.3.** Hongos aislados (+) en las parcelas prospectadas en las fechas mostradas a partir de muestras de almendro y albaricquero con síntomas de decaimiento y muerte de ramas tomadas en las mismas. (Np: *Neofusicoccum parvum*, Ni: *N. luteum*, Nm: *N. mediterraneum*, Do: *Diplodia olivarum*, Ds: *D. seriata*, Phi: *Phaeoacremonium iranianaum*, Phv: *Pm. venezuelense*, Pham: *Pm. amygdalinum*, Phmi: *Pm. minimum*, Ch: *Collophora hispanica*, Ei: *Eutypa lata*, Ele: *Eutypa leptoplaca*, Oo: *Omphalotus olearius*, Pp: *Phellinus pomaceus*, Fm: *Fomitiporia mediterranea* Pr: *Pleurostomophora richardsiae* (los +\* son aislados de albaricqueros).

Parcela	Localidad	Fecha muestreo	Hongos aislados																
			Np	Ni	Nm	Do	Ds	Phi	Phv	Pham	Phmi	Ch	Ei	Ele	Oo	Pp	Fm	Pr	
1	Sant Llorenç des C.	12/05/2009	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
		13/08/2009	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		09/09/2009	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		18/02/2010	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14/05/2010	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		06/07/2011	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		26/06/2012	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		28/05/2014	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Sant Llorenç des C.	09/09/2009	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		18/02/2010	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/04/2010	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		14/05/2010	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		09/07/2011	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
		24/06/2012	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		13/08/2009	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14/05/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	Sant Llorenç des C.	13/08/2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		11/02/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		13/08/2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		13/08/2009	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/06/2012	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
		05/07/2013	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		13/08/2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/06/2012	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
7	Sant Llorenç des C.	05/07/2013	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		09/09/2009	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14/05/2010	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		09/07/2011	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		05/07/2013	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		11/01/2010	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		15/09/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		02/09/2010	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Santa María	15/09/2010	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		09/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/06/2012	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		09/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/06/2012	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		09/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24/06/2012	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Santa María	24/06/2012	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Santa María	24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3.3.** (continuación)

Parcela	Localidad	Fecha muestreo	Hongos aislados																	
			Np	Ni	Nm	Do	Ds	Phi	Phv	Pham	Phmi	Ch	El	Ele	Oo	Pp	Fm	Pt		
16	Lucmajor	09/07/2011	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
17	Lucmajor	09/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
18	Lucmajor	09/07/2011	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19	Santa María	04/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Bimissalem	09/07/2011	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
21	Bimissalem	09/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	Sant Joan	24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
23	Consell	24/06/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Manacor	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Manacor	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Santa María	05/07/2013	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
27	Bimissalem	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Bimissalem	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Sencelles	28/05/2014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Sencelles	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Lucmajor	05/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
32	Lucmajor	12/03/2014	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Lucmajor	12/03/2014	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Sant Antoni (Ibiza)	28/03/2014	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

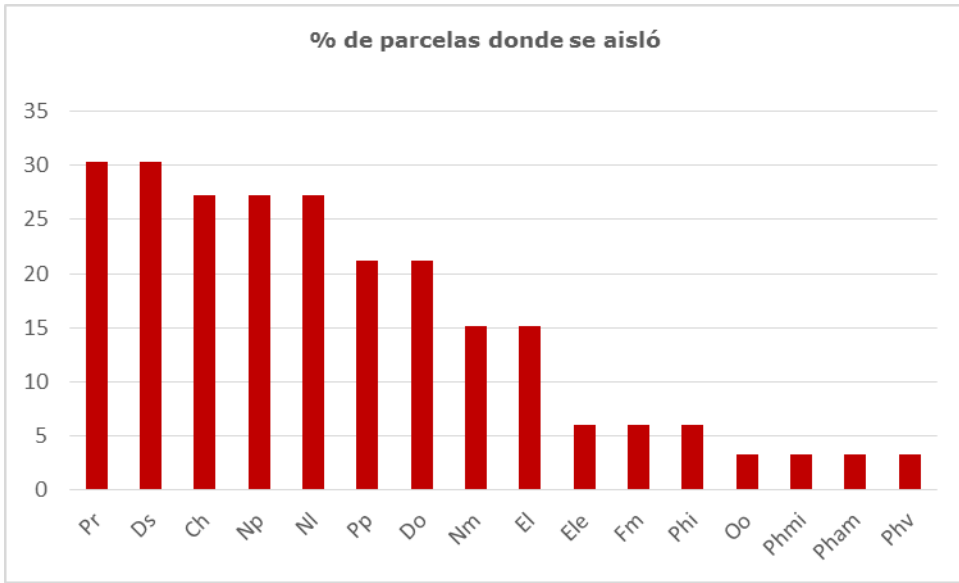
**Tabla 3-4.** Hongos aislados (+) en las parcelas prospectadas a partir de muestras de almendro y albaricoquero con síntomas de decaimiento y muerte de ramas tomadas en las mismas. (Np: *Neofusicoccum parvum*, Ni: *N. luteum*, Nm: *N. mediterraneum*, Do: *Diplodia oliviarum*, Ds: *D. seriata*, Phi: *Phaeoacremonium iranianum*, Phv: *Pm. venezuelense*, Pham: *Pm. amygdalinum*, Phmi: *Pm. minimum*, Ch: *Collophora hispanica*, Eli: *Eutypa lata*, Ele: *Eutypa leptoplaca*, Oo: *Omphalotus olearius*, Pp: *Phellinus pomaceus*, Fm: *Fomitiporia mediterranea* Pr: *Pleurostomophora richardsiae* (los +\* Son aislados de albaricoqueros).

Parcela	Localidad	Hongos aislados													Nº de especies aisladas				
		Np	Ni	Nm	Do	Ds	Phi	Phv	Pham	Phmi	Ch	EI	Ele	Oo		Pp	Fm	Pr	
1	Sant Llorenç des Cardassar	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	9
2	Sant Llorenç des Cardassar	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	11
3	Sant Llorenç des Cardassar	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4	Sant Llorenç des Cardassar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
5	Sant Llorenç des Cardassar	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	5	
6	Sant Llorenç des Cardassar	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	5	
7	Sant Llorenç des Cardassar	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
8	Sant Llorenç des Cardassar	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3	
9	Sencelles	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
10	Son Servera	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
11	Manacor	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
12	Santa María	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4	
13	Santa María	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3	
14	Santa María	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
15	Santa María	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
16	Lucmajor	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5	
17	Lucmajor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2	
18	Lucmajor	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2	
19	Santa María	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
20	Binissalem	+*	-	-	-	+*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+*	5	
21	Sant Joan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	
22	Consell	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
23	Manacor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
24	Manacor	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
25	Santa María	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2	
26	Binissalem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
27	Binissalem	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
28	Sencelles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
29	Lucmajor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
30	Lucmajor	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
31	Lucmajor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
32	Lucmajor	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
33	Sant Antoni (Ibiza)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	

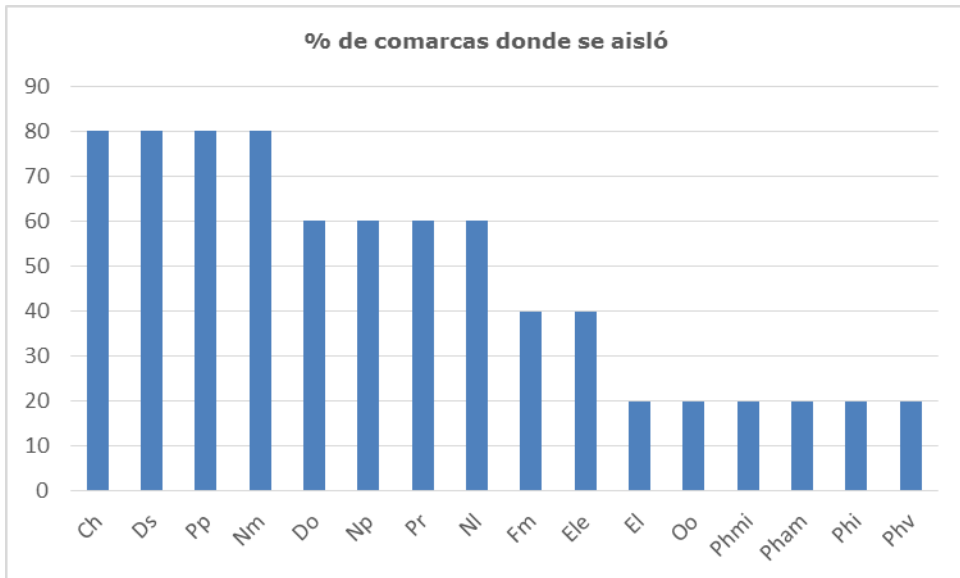


**Tabla 3.5.** Especies fúngicas aisladas en las prospecciones en parcelas de almendros y albaricoqueros con síntomas de decaimiento y muerte de ramas entre 2009 y 2014, junto con el número de parcelas y comarcas en las que se encontraron dichas especies y los porcentajes respectivos respecto al total de parcelas y comarcas prospectadas.

<b>Especie</b>	<b>Nº de parcelas en las que se aisló</b>	<b>% de parcelas donde se aisló, respecto al total de 33 parcelas prospectadas</b>	<b>Nº de comarcas en las que se aisló</b>	<b>% de comarcas donde se aisló, respecto al total de 5 comarcas prospectadas</b>
<i>Collophora hispanica</i> (Ch)	9	27,27	4	80
<i>D. olivarum</i> (Do)	7	21,21	3	60
<i>D. seriata</i> (Ds)	10	30,30	4	80
<i>Eutypa lata</i> (El)	5	15,15	1	20
<i>Eutypa leptoplaca</i> (Ele)	2	6,06	2	40
<i>Fomitiporia mediterranea</i> (Fm)	2	6,06	2	40
<i>N. luteum</i> (NI)	9	27,27	3	60
<i>N. mediterraneum</i> (Nm)	5	15,15	4	80
<i>N. parvum</i> (Np)	9	27,27	3	60
<i>Omphalotus olearius</i> (Oo)	1	3,30	1	20
<i>Phaeoacremonium minimum</i> (Phmi)	1	3,30	1	20
<i>Pm. amygdalinum</i> (Pham)	1	3,30	1	20
<i>Pm. iranianum</i> (Phi)	2	6,06	1	20
<i>Pm. venezuelense</i> (Phv)	1	3,30	1	20
<i>Phellinus pomaceus</i> (Pp)	7	21,21	4	80
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (Pr)	10	30,30	3	60



**Figura 3.8.** Porcentajes de parcelas donde se aisló cada hongo. (Pr: *Pleurostomophora richardsiae*, Ds: *Diplodia seriata*, Ch: *Collophora hispanica*, Np: *Neofusicoccum parvum*, Nl: *Neofusicoccum luteum*, Pp: *Phellinus pomaceus*, Do: *Diplodia olivarum*, Nm: *Neofusicoccum mediterraneum*, El: *Eutypa lata*, Ele: *Eutypa leptoplaca*, Fm: *Fomitiporia mediterranea*, Phi: *Phaeoacremonium iranianaum*, Oo: *Omphalotus olearius*, Phmi: *Phaeoacremonium minimum*, Pham: *Phaeoacremonium amygdalinum*, Phv: *Phaeoacremonium venezuelense*).



**Figura 3.9.** Porcentajes de comarcas donde se aisló cada hongo (leyenda de las especies fúngicas en figura anterior).

Los resultados de este estudio muestran la incidencia y diversidad de hongos patógenos de la madera asociados a síntomas de marchitez y seca de ramas de almendros en Mallorca.

Como se observa en las Tablas 3.3 y 3.4, las especies de Botryosphaeriaceae constituyeron el grupo más abundante. Se identificaron cinco especies de esta familia, siendo *D. seriata* (detectada en el 30,30 % de las parcelas prospectadas), *N. parvum* (en el 27,27 %) y *N. luteum* (en el 27,27 %) las especies más frecuentes, aislándose en más del 25 % de las parcelas prospectadas. Además de estas especies de Botryosphaeriaceae, también se encontraron *D. olivarum* (en el 21,21 %) y *N. mediterraneum* (en el 15,15 %).

*Pleurostomophora richardsiae*, aislada en el 30,30 % de las parcelas prospectadas y que pertenece a la familia Herpotrichiellaceae fue, junto a *D. seriata*, la especie que se detectó en más parcelas. Además, se aisló también en una muestra de albaricoquero.

Como se aprecia en la Tabla 3.5., también fue muy frecuente la presencia de la nueva especie *C. hispanica*, que se aisló en nueve parcelas (27,27 %).

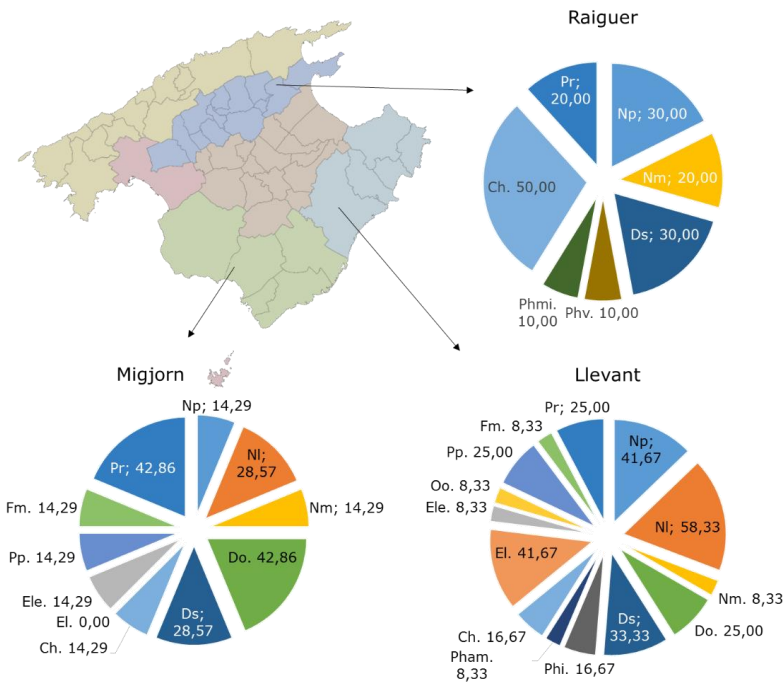
Se aislaron cuatro especies del género *Phaeoacremonium*, concretamente, *Pm. amygdalinum*, y *Pm. iranianum* que se aislaron de una y dos parcelas de almendro, respectivamente; y *Pm. minimum* y *Pm. venezuelense* que se aislaron sólo en la parcela de albaricoqueros incluida en las prospecciones.

En cinco parcelas (15,15 %) se encontró la especie *E. lata*, todas de la misma comarca (Llevant), mientras que *Eutypa leptoplaca* se encontró en dos parcelas de distintas comarcas, Llevant y Migjorn.

En este estudio, también se aislaron hongos basidiomicetos en muestras de nueve de las parcelas (27,27 %), concretamente, se aislaron tres especies:

*Phellinus pomaceus* en siete parcelas, *F. mediterranea* en 2 parcelas y *O. olearius* en una parcela en la que también se había aislado *P. pomaceus*.

En la Figura 3.10. se muestra la frecuencia de parcelas en las que se aisló cada especie dentro de cada comarca.



**Figura 3.10.** Frecuencia de las especies fúngicas aisladas en cada una de las tres comarcas más relevantes, expresada como porcentaje de parcelas donde se encontró la especie sobre el total de parcelas prospectadas en la comarca. (Np: *Neofusicoccum parvum*, Nl: *Neofusicoccum luteum*, Nm: *Neofusicoccum mediterraneum*, Do: *Diplodia olivarium*, Ds: *Diplodia seriata*, Phi: *Phaeoacremonium iranianaum*, Phv: *Phaeoacremonium venezuelense*, Pham: *Phaeoacremonium amygdalinum*, Phmi: *Phaeoacremonium minimum*, Ch: *Collophora hispanica*, El: *Eutypa lata*, Ele: *Eutypa leptoplaca*, Pr: *Pleurostomophora richardsiae*, Pp: *Phellinus pomaceus*, Fm: *Fomitiporia mediterranea*, Oo: *Omphalotus olearius*).

Como se aprecia en la Tabla 3.5 y en la Figura 3.9., en general, las especies que se aislaron con más frecuencia, es decir, en mayor número de parcelas, fueron a su vez las que se hallaron más distribuidas en las distintas comarcas. Aunque, *P. richardsiae* y *N. luteum* estuvieron entre las especies aisladas con mayor frecuencia, en 10 y 9 parcelas respectivamente, éstas sólo se aislaron en 3 de las 5 comarcas prospectadas. Por otro lado, también se observa que la comarca en la que se encontraron mayor número de especies distintas fue la comarca de Llevant, donde se aislaron 14 de las 16 especies totales encontradas.

### III.3. DISCUSIÓN.

*D. seriata* es una de las especies más frecuentes en las prospecciones que aquí se presentan. Se trata de un patógeno con un amplio rango de hospedantes (Punithalingam y Waller, 1973). Como ejemplo, Farr *et al.* (2015) citan 353 hospedantes para la especie *Botryosphaeria obtusa* (= *D. seriata*). *Diplodia seriata*, es una de las especies más comunes asociadas al decaimiento de la vid (Úrbez-Torres, 2011). Esta especie se ha asociado a enfermedades en olivos en California (Úrbez-Torres *et al.*, 2013), Croacia (Kaliterna *et al.*, 2012) y España (Moral *et al.*, 2007) y, recientemente, a pudriciones de fruto en níspero japonés (Palou *et al.*, 2013) o en desecamiento de cedros del Himalaya (*Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don.) en China (Jiao *et al.*, 2014).

La alta frecuencia que ha mostrado *D. seriata* de nuestras prospecciones coincide con los resultados obtenidos por otros autores en otros cultivos como Damm *et al.* (2007a), que aislaron mayoritariamente *D. seriata* (43 de 67 aislados) en nectarinos, melocotoneros y ciruelos japoneses en Sudáfrica. Ésta también fue la especie más abundante en dos estudios sobre Botryosphaeriaceae en frutales de hueso y pepita en Sudáfrica (Slippers *et al.*, 2007; Cloete *et al.*, 2011). Sin embargo, en almendro, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Inderbitzin *et al.* (2010) respecto la importancia de *D. seriata*, que para dichos investigadores consistía en una especie minoritaria.

Por otra parte, *N. parvum*, que también se aisló en numerosas parcelas, es un patógeno habitual en frutales de hueso y de pepita en todo el mundo (Slippers *et al.*, 2007). Como patógeno de almendro se citó, junto a otras especies de Botryosphaeriaceae, en 2010 en California (Inderbitzin *et al.*, 2010). Además, es una de las especies asociadas al decaimiento causado por Botryosphaeria en el cultivo de la vid (Úrbez-Torres, 2011). En varios países se ha asociado a marchitamiento en arándanos (*Vaccinium* spp.) (Wright *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012, Castillo *et al.*, 2013; Koike *et al.*, 2014), también causa diversas patologías en aguacate, como manchas en fruto (Molina-Gayoso *et al.*, 2012), decaimiento del árbol (Zea-Bonilla *et al.*, 2007) y chancros en ramas (McDonald *et al.*, 2009). En Grecia, *N. parvum* se encontró causando pudriciones de frutos y seca de brotes de melocotoneros (Thomidis *et al.*, 2011). En California (EE. UU.) se asoció a chancros de ramas de cítricos (Adesemoye y Eskalen, 2011a). En España se ha aislado de nogales y ciruelos (Moral *et al.*, 2010).

Respecto a *N. luteum*, los resultados muestran una alta frecuencia de esta especie en los almendros muestreados. Esta especie fue aislada frecuentemente en vid con síntomas de chancros y decaimiento (Van Niekerk *et al.*, 2004, Luque *et al.*, 2009, Úrbez-Torres y Gubler, 2009, Chebil *et al.*, 2014). Esta especie se citó por primera vez como *Fusicoccum luteum* en kiwi, peral y manzano en Nueva Zelanda (Pennycook y Samuels, 1985). También se ha encontrado afectando a otros cultivos como olivo (Sergeeva *et al.*, 2009, Úrbez-Torres *et al.*, 2013) o aguacate (McDonald *et al.*, 2009) en California. En España, *N. luteum* se aisló de rododendros con manchas en hojas, chancros y marchiteces en brotes y ramas (Pintos *et al.*, 2011b) y de caquis (*Diospyros kaki* Thunb.) asociado a pudriciones postcosecha en fruto (Palou *et al.*, 2013). En Portugal, se aisló *N. luteum* y *N. australe* asociados a chancros y marchiteces en robles (Barradas *et al.*, 2013).

Por otro lado, la especie *D. olivarum* se describió recientemente asociada a enfermedades de olivo (Lazziera *et al.*, 2008a) y, desde entonces, sólo se había aislado de algarrobos con síntomas de enrojecimiento de hojas, y

decaimiento y chancros en ramas (Granata *et al.*, 2011), y de vid con síntomas de decaimiento por *Botryosphaeria* (Linaldeddu *et al.*, 2015), en ambos casos en Italia. Constituyen, por tanto, los resultados de las prospecciones realizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral la primera vez que se cita este patógeno en almendro.

*Neofusicoccum mediterraneum* es una de las especies de Botryosphaeriaceae más frecuentes afectando a almendro en California (Inderbitzin *et al.*, 2010). Este hongo se ha encontrado también asociado a chancros y decaimiento de vid en España (Martín *et al.*, 2011; Pintos *et al.*, 2011a) y en California (Úrbez-Torres *et al.*, 2010). También se encontró en las plantas madres de los patrones de vid en varios viveros en España (Aroca *et al.*, 2010). Lazzizzera *et al.* (2008b) aislaron, aunque con baja frecuencia (1 %), *N. mediterraneum* en aceitunas con pudriciones en el sur de Italia, donde encontraban otras especies de Botryosphaeriaceae con más frecuencia como *Botryosphaeria dothidea* (34 %) o *N. australe* (16 %). Posteriormente Moral *et al.* (2010) aislaron *N. mediterraneum* de olivos y pistachos que presentaban seca de ramas, tanto en España como en California. También se ha aislado *N. mediterraneum* causando diversas enfermedades en nogal (Trouillas *et al.*, 2010b) y granados (Morgan y Michailides, 2012) en California y caquis en España (Palou *et al.*, 2013).

El hongo *P. richardsiae* que, como se ha visto, fue junto a *D. seriata* la especie que se detectó en más parcelas, es un patógeno emergente que se ha asociado con enfermedades de madera de la vid en California (Rolshausen *et al.*, 2010) y en el sur de Italia (Carlucci *et al.*, 2015). Halleen *et al.* (2007) realizaron ensayos de patogenicidad e inocularon *P. richardsiae* en vides tanto en invernadero como en campo en Sudáfrica, causando una decoloración en los vasos similar a la que provocan los hongos asociados a la enfermedad de Petri. Además, esta especie se consideró como el patógeno más agresivo entre los hongos aislados en muestras en olivo que mostraban síntomas de decaimiento en Italia (Carlucci *et al.*, 2013).

*Collophora* fue propuesto como nuevo género por Damm *et al.* (2010) y en concreto, la especie *C. rubra* se aisló en madera necrótica de almendros en Sudáfrica (Damm *et al.* 2010). Como hemos visto, en nuestro estudio se ha encontrado la nueva especie *C. hispanica*, que además mostró una alta frecuencia, aislándose en nueve parcelas.

Respecto a los hongos del género *Phaeoacremonium* aislados en las prospecciones, éstos han mostrado una baja frecuencia y distribución. Sin embargo, tienen un papel importante en el decaimiento de otros cultivos, como se ha demostrado en el caso de las enfermedades fúngicas de la madera en vid (Gramaje y Armengol, 2011; Gramaje *et al.*, 2015). Es precisamente en vid donde los hongos del género *Phaeoacremonium* se encuentran más frecuentemente asociados a enfermedades de la de madera en varios países (Larignon y Dubos, 1997; Scheck *et al.*, 1998; Dupont *et al.*, 2000; Armengol *et al.*, 2001; Martin y Cobos, 2007; Gramaje *et al.*, 2007, 2008, 2009a, 2009b; Romero-Rivas *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2010; Abreo *et al.*, 2011; Mohammadi y Banihashemi, 2012; Ozben *et al.*, 2012; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Recientemente también se han encontrado varias especies de *Phaeoacremonium* en perales y manzanos (Cloete *et al.*, 2011). *Phaeocremonium minimum* se ha encontrado asociado a secas de ramas y brotes de olivo en el sur de Italia (Carlucci *et al.*, 2013) y California (Úrbez-Torres *et al.*, 2013), mientras que *Pm. iranianum* se ha encontrado afectando a kiwis en Italia (Mostert *et al.*, 2006) y manzanos en Irán (Arzanlou *et al.*, 2014). En el género *Prunus* tampoco faltan citas de especies de *Phaeoacremonium*, como se observa en la Tabla 1.4. de la introducción general de esta Tesis. Concretamente, se han encontrado hasta 12 especies de este género en cultivos como el melocotonero, el albaricoquero o la nectarina, aunque en lo que se refiere al almendro, esta Tesis supone la primera cita de especies de *Phaeoacremonium* afectando a este cultivo. Respecto las especies de *Phaeoacremonium* encontradas en la muestra de albaricoque incluida en las prospecciones, la especie *Pm. minimum* ya se había citado en este cultivo en Sudáfrica (Damm *et al.*, 2008b) e Iran (Arzanlou *et al.*, 2014), mientras que la especie *Pm. venezuelense* supone la primera cita en



albaricoque, ya que hasta la fecha ésta sólo se había citado en vid en Sudáfrica (Mostert *et al.*, 2005) y Argelia (Berraf-Tebbal *et al.*, 2011).

En las prospecciones se encontraron también dos especies de Diatrypaceae. Por un lado, *E. lata* es un patógeno importante de cultivos tales como albaricoque y la vid y se ha encontrado en todo el mundo (Carter, 1957). Esta especie también se ha registrado asociada con chancros en los almendros en Australia (Carter, 1982) y Grecia (Rumbos, 1985). La otra especie de esta familia que se encontró en las prospecciones fue *E. leptoplaca*, que ha sido citada como patógeno de vid en California (Trouillas y Gubler, 2004), mientras que Trouillas *et al.* (2011) encontraron esta especie en *Fraxinus*, *Ficus*, *Populus* y *Quercus*. Este trabajo supone la primera vez que se aísla *E. leptoplaca* en almendro. Ambas especies de Diatrypaceae deben ser consideradas como potenciales patógenos para el almendro.

Finalmente, la identificación de hongos basidiomicetos como agentes causales de algunas enfermedades de la madera, es muy conocida, especialmente cuando se manifiestan síntomas de esponjamiento de la madera, o síntomas del tipo yesca. Uno de los cultivos donde más se han estudiado estos síntomas es la vid. En este cultivo, Larignon y Dubos (1987) comprobaron la implicación en las enfermedades de la madera de *Phellinus sp.*, aunque como invasor secundario después de la infección inicial causada por otros hongos como *E. lata* o *Cephalosporium sp.* Así mismo, *Fomitiporia punctata* (P. Karst.) Murrill y posteriormente *F. mediterranea*, *F. australiensis* M. Fisch., J. Edwards, Cunningt. & Pascoe y *F. polymorpha* M. Fisch., también se asociaron con enfermedades de madera de la vid (Cortesi *et al.*, 2000; Fischer, 2002; Fischer 2006). Recientemente, Cloete *et al.* (2015) en vid en Sudáfrica remarcaron la importancia y diversidad de especies de Basidiomicetos asociadas a pudriciones de madera del tipo yesca. Por otro lado, también se ha encontrado *F. mediterranea* como principal hongo asociado a pudriciones de madera de cítricos en el sur de Italia, aislándose también *Phellinus spp.*, aunque con menor frecuencia (Roccoltelli *et al.*, 2014).



## **IV.** Patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en almendro

---



# IV. PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE Y DIATRYPACEAE EN ALMENDRO

---

Como se ha visto en el Capítulo III, las prospecciones realizadas en Mallorca en parcelas de almendros con síntomas de decaimiento y marchitez de ramas revelaron la presencia de 14 especies fúngicas que podrían estar implicadas en el desarrollo de dichos síntomas. El grupo más frecuente fue el de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae: *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*, que constituye un grupo de patógenos de la madera de importancia creciente en almendro (Inderbitzin *et al.*, 2010) y otros cultivos (Van Niekerk *et al.*, 2004; Damm *et al.*, 2007a; Moral *et al.* 2010; Eskalen *et al.*, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2013). Junto a éstas, también se encontraron dos especies del género *Eutypa* (fam. Diatrypaceae), concretamente *Eutypa lata* y *E. leptoplaca*, siendo el primero un patógeno conocido de madera en albaricoquero y vid, que se ha citado también en almendro (Carter, 1982; Rumbos, 1985). Sin embargo, los estudios de patogenicidad con estos hongos en almendro son escasos, ya que los ensayos de Carter (1982) y Rumbos (1985), sólo incluyen *Eutypa lata* y, aunque Inderbitzin *et al.* (2010) en California y Martos (2008) en Cataluña realizaron ensayos de patogenicidad con hongos de la familia Botryosphaeriaceae, éstos no incluyeron *D. olivarum*.

Dados estos antecedentes, se decidió realizar un ensayo de patogenicidad en almendro con aislados de las cinco especies de Botryosphaeriaceae y aislados de las dos especies de Diatrypaceae, procedentes de las prospecciones de almendros en Mallorca.

## IV.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

### IV.1.1. MATERIAL VEGETAL Y PLANTACIÓN.

En este ensayo se inocularon almendros de cuatro variedades, seleccionadas entre las más habituales en Mallorca. Éstas fueron las variedades tradicionales mallorquinas 'Pons', 'Vivot' y 'Jordi', y la variedad 'Ferragnes', de origen francés. En todos los casos, éstas estaban injertadas sobre el portainjerto GF-677 (*P. dulcis* x *P. persica*). En el momento de la plantación, había transcurrido aproximadamente 10 meses desde que los almendros habían sido injertados y se habían mantenido durante ese tiempo en vivero. Los árboles se plantaron en el mes de diciembre de 2012 en una parcela al aire libre de unos 5000 m<sup>2</sup>, situada en Palma de Mallorca. Se plantaron un total de 480 árboles en 8 filas de 60 árboles con un marco de 4 m entre filas por 1,2 m entre plantas, salvo entre el árbol 30 y el árbol 31 de cada fila, en cuyo caso se dejó un espacio de 6 metros entre ellos, de manera que cada fila tenía dos grupos de 30 árboles separados y correspondieron a diferentes variedades como veremos a continuación en el apartado IV.1.3 (Figuras 4.1 y 4.2).



**Figura 4.1.** Vista general de la parcela en junio de 2013, dos meses después de la inoculación del primer año.



**Figura 4.2.** Vista aérea de la parcela donde se realizaron los ensayos de inoculación con representación de los 4 bloques y la distribución de las 4 variedades de almendro en cada uno de ellos. (X: 'Ferragnes', \*: 'Pons', O: 'Jordi', +: 'Vivot').

#### IV.1.2. AISLADOS FÚNGICOS.

Las especies fúngicas a inocular se seleccionaron por su presencia en las prospecciones realizadas con anterioridad (Capítulo III) así como por el interés que pudieran tener como potenciales patógenos en almendro. Concretamente, se eligió un aislado de cada una de las siguientes especies: *D. seriata*, *D. olivarum*, *E. lata*, *E. leptoplaca*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum* (Tabla 4.1.).

**Tabla 4.1.** Aislados y origen de las especies de hongos de las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae que se eligieron para los ensayos de patogenicidad.

<b>Especie</b>	<b>Código</b>	<b>Parcela</b>	<b>Localización</b>	<b>Año</b>
<i>Diplodia olivarum</i>	BAL-1	1	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)	2009
<i>Diplodia seriata</i>	BAL-4	14	Santa Maria (Es Raiguer)	2012
<i>Eutypa lata</i>	4.36	4	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)	2009
<i>Eutypa leptoplaca</i>	6.2	16	Llucmajor (Migjorn)	2011
<i>Neofusicoccum luteum</i>	BAL-6	2	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)	2010
<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	BAL-3	2	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)	2010
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BAL-7	2	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)	2012

#### IV.1.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

La parcela se dividió en 4 bloques, de dos filas de árboles cada uno. En cada bloque se distribuyó al azar la posición de los 4 grupos (2 por fila) de 30 árboles, correspondientes a las 4 variedades de almendro ensayadas (Figura 4.2). Posteriormente, se distribuyó al azar el orden los hongos a inocular en cada una de las variedades. Este tipo de diseño se conoce diseño en parcelas divididas o "split-splot" donde la variedad sería el factor principal (primero aleatorizado) y el hongo a inocular sería el factor subordinado, que se distribuye al azar en segundo lugar y dentro de cada una de las subparcelas de las variedades.

El experimento consistió en tres repeticiones para cada hongo, en posiciones consecutivas, en cada variedad de cada bloque. También se inocularon tres almendros control (sólo con PDA) en cada variedad de cada bloque, cuya posición también se eligió al azar.



De todo el ensayo se realizaron dos réplicas en años consecutivos (2013 y 2014), inoculando en primavera (abril) y evaluando en el invierno siguiente (enero-febrero). Para el segundo año se utilizó madera sana de los mismos árboles, distribuyendo aleatoriamente la posición de los hongos a inocular.

#### IV.1.4. INOCULACIÓN.

Para la inoculación, se levantó una sección de la corteza del tronco de las plantas de 8 mm de diámetro en la corteza del tronco con la ayuda de un sacabocados. En la herida se depositó un disco de micelio del mismo tamaño extraído de la zona de avance de la colonia (crecimiento activo) de una placa del aislado fúngico correspondiente, crecida en medio de cultivo PDA durante siete días a 25 °C. El disco de PDA con hongo se colocó de manera que el micelio entrase en contacto con el cambium del árbol. La herida se selló inmediatamente con Parafilm® para evitar la desecación y la caída del disco con el hongo. En la Figura 4.3 se puede observar con detalle el proceso de inoculación.



**Figura 4.3.** Detalle del proceso de inoculación. a): materiales utilizados, b): realización de la apertura con el sacabocados, c): colocación del disco de PDA, d): recubrimiento con Parafilm®.

#### IV.1.5. EVALUACIÓN.

Después de la inoculación, y en ambos años del ensayo, la parcela se visitó cada 15 días hasta el momento de la evaluación, con el objetivo de observar la evolución de los síntomas que fueron apareciendo, además de realizar las labores propias de mantenimiento de los árboles cuando fue necesario, tales como riegos o eliminación de malas hierbas.

Aunque Inderbitzin *et al.* (2010) evaluaron la patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae en almendro a los 54 días de la inoculación, en nuestro caso, al contar también con especies de *Eutypa*, se decidió esperar nueve meses, basándonos en el estudio de patogenicidad de Pitt *et al.* (2013) con especies de Diatrypaceae en vid.

Para la evaluación del ensayo, en cada árbol se cortó el fragmento de tronco afectado que mostraba síntomas internos, asegurándonos de que sólo quedase madera sana en el árbol que quedó en la parcela. Los fragmentos se llevaron a laboratorio y se descortezaron para poder observar y medir la lesión interna generada. De estas lesiones se obtuvo la longitud total desde el punto de inoculación, teniendo en cuenta la longitud de lesión producida en sentido acrópeto y la producida en sentido basípeto y se restó el diámetro del sacabocados (0,8 cm) utilizado para realizar la herida para la inoculación. También se procedió al reaislamiento del patógeno en laboratorio a partir algunas de las plantas de cada combinación, mediante la siembra de fragmentos del frente de avance de las lesiones en medio de cultivo PDA con la adición de 0,5 g/l de sulfato de estreptomina (PDAS), con el objetivo de comprobar que se cumplieran los postulados de Koch.

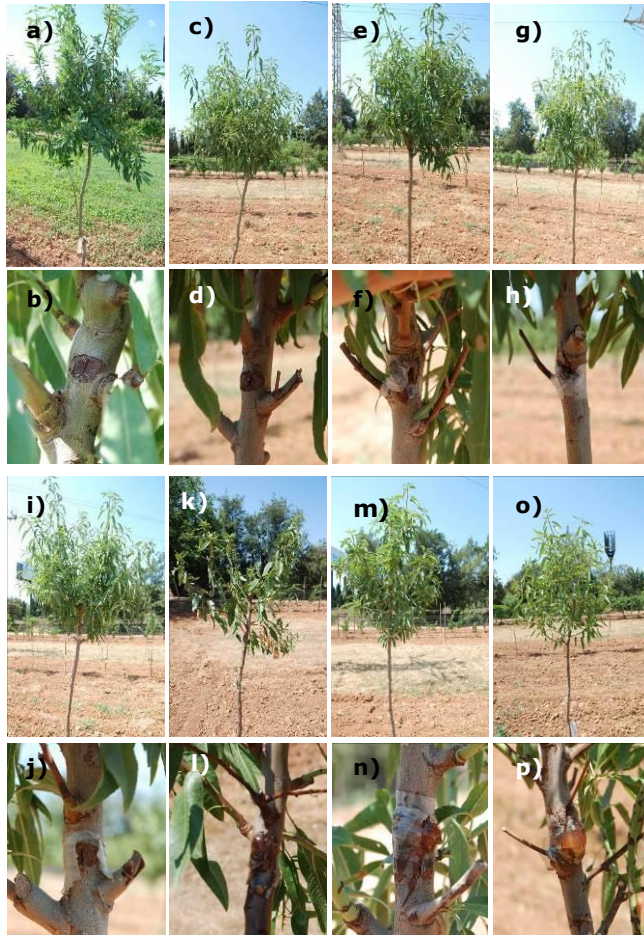
#### IV.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las longitudes de las lesiones producidas por los diferentes hongos en las diferentes variedades de almendro inoculadas se realizó mediante un análisis de varianza con el programa informático Statistix 10.0 (Analytical Software<sup>®</sup>, Tallahassee, FL., EE. UU.).

### **IV.2 RESULTADOS.**

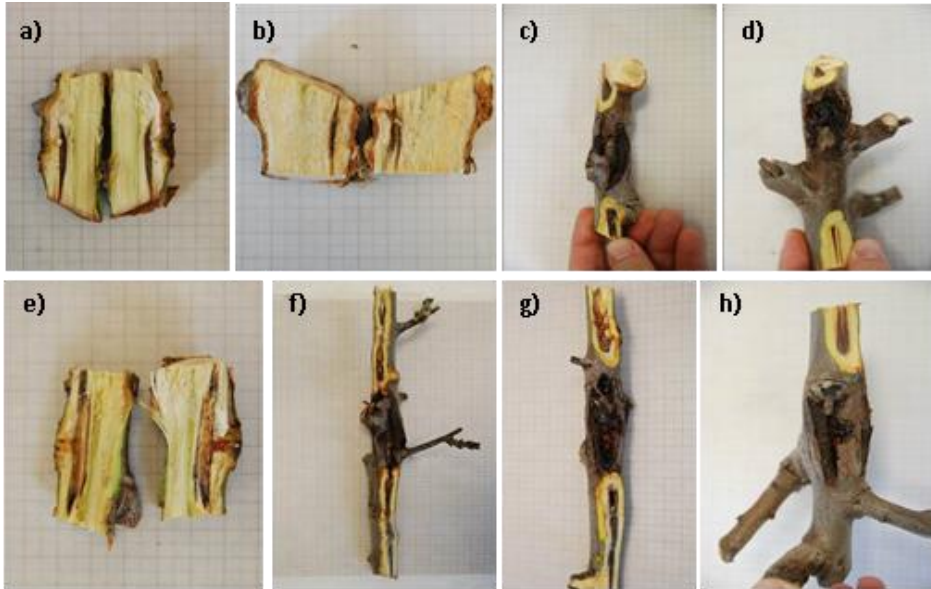
Durante el seguimiento de la parcela en los dos años de estudio se observó que se desarrollaron chancros con emisión de goma en los almendros inoculados con especies del género *Neofusicoccum* y con *D. seriata*, mientras que los que habían sido inoculados con *D. olivarum*, las especies de

Diatrypaceae y los almendros control apenas mostraron síntomas externos (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Vista general y detalle de los síntomas observados a los 4 meses de la inoculación en algunos de los almendros inoculados en el ensayo de patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae. a) y b): variedad 'Vivot' inoculada con el control (sólo PDA), c) y d): variedad 'Vivot' inoculada con *Diplodia olivarum*, e) y f): variedad 'Vivot' inoculada con *D. seriata*, g) y h) variedad 'Vivot' inoculada con *Eutypa lata*, i) y j) variedad 'Vivot' inoculada con *E. leptoplaca*, k) y l): variedad 'Ferragnes' inoculada con *Neofusicoccum luteum*, m) y n): variedad 'Pons' inoculada con *N. mediterraneum* y o) y p): variedad 'Jordi' inoculada con *N. parvum*.

Los síntomas externos se correspondían con necrosis internas (Figura 4.5) cuyas longitudes medias se muestran en la Tabla 4.2.



**Figura 4.5.** Detalle de las necrosis internas. Las imágenes corresponden a: a): variedad 'Vivot' inoculada con el control (sólo PDA), b): variedad 'Vivot' inoculada con *Diplodia olivarum*, c): variedad 'Pons' inoculada con *D. seriata*, d): variedad 'Pons' inoculada con *Eutypa lata*, e): variedad 'Vivot' inoculada con *E. leptoplaca*, f): variedad 'Pons' inoculada con *Neofusicoccum luteum*, g): variedad 'Pons' inoculada con *N. mediterraneum*, h): variedad 'Pons' inoculada con *N. parvum*.

**Tabla 4.2.** Media y error estándar de las longitudes de las lesiones internas (cm) causadas por especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae en las cuatro variedades de almendro inoculadas en los dos años del ensayo.

<b>Año 2013</b>	<b>'Ferragnes'</b>		<b>'Jordi'</b>		<b>'Pons'</b>		<b>'Vivot'</b>	
	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>
Control	0,85	±0,31	2,05	±0,66	3,58	±0,81	2,98	±0,67
<i>D. olivarum</i>	3,93	±0,72	5,56	±0,76	7,08	±1,69	7,16	±1,79
<i>D. seriata</i>	9,11	±0,97	14,94	±1,82	10,48	±1,13	23,00	±3,15
<i>E. lata</i>	17,49	±1,45	10,54	±2,8	9,56	±0,85	28,70	±3,48
<i>E. leptoplaca</i>	4,79	±0,79	4,8	±1,02	4,92	±0,75	6,26	±1,02
<i>N. luteum</i>	52,51	±3,83	33,45	±3,48	53,38	±5,98	56,56	±4,18
<i>N. mediterraneum</i>	21,94	±3,14	16,65	±1,07	21,41	±1,59	34,43	±2,95
<i>N. parvum</i>	29,7	±2,49	21,3	±2,036	19,62	±1,11	23,90	±2,91

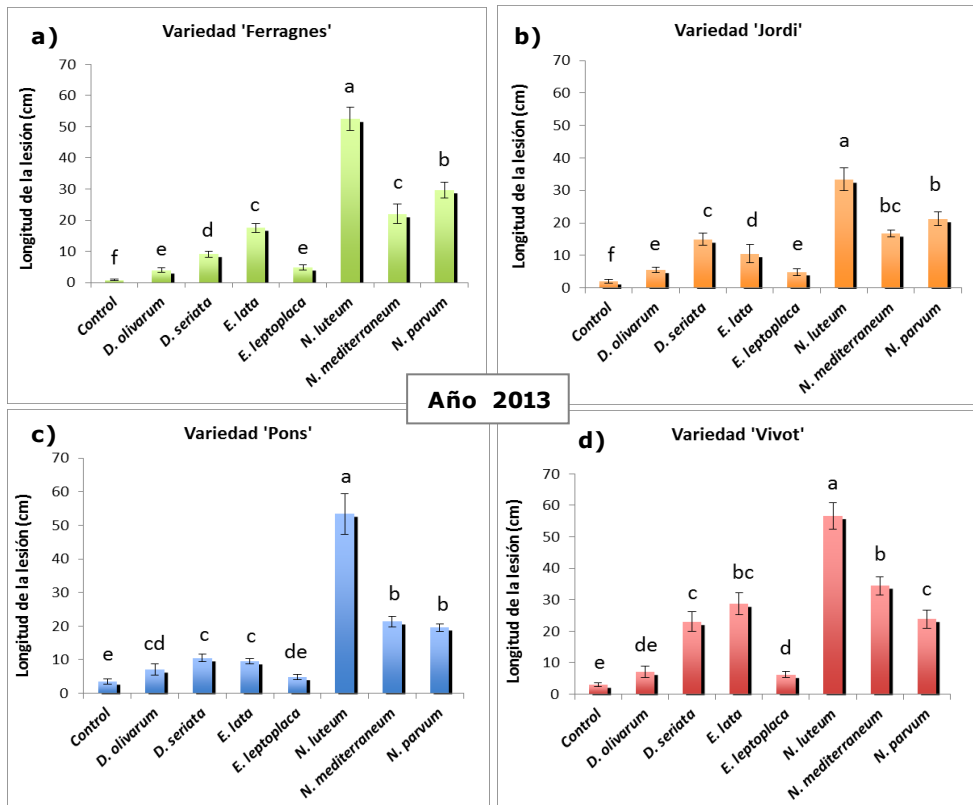
<b>Año 2014</b>	<b>'Ferragnes'</b>		<b>'Jordi'</b>		<b>'Pons'</b>		<b>'Vivot'</b>	
	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>	Lesión	Error <sup>1</sup>
Control	0,4	±0,4	0,4	±0,4	1,66	±1,17	0,33	±0,33
<i>D. olivarum</i>	1	±0,63	3,06	±2,58	10,83	±5,36	-	-
<i>D. seriata</i>	3,83	±2,2	-	-	10,1	±3,63	-	-
<i>E. lata</i>	5,4	±2,15	6,95	±1,55	16	±3,8	10,66	±4,48
<i>E. leptoplaca</i>	2,5	±1,03	-	-	9,25	±2,58	-	-
<i>N. luteum</i>	7,92	±0,92	8,25	±1,75	17,86	±4,69	11,2	±2,43
<i>N. mediterraneum</i>	26,7	±2,84	19,45	±2,45	25,9	±3,13	20,4	±3,77
<i>N. parvum</i>	22,6	±3,04	22,35	±2	23,2	±2,36	-	-

1: Error estándar de los valores de las longitudes de las lesiones. La ausencia de valores medios de la lesión y del error estándar de algunas combinaciones hongo x variedad (-) se debe a que no se disponía de datos suficientes para un análisis estadístico a causa de la muerte de algunos árboles y se decidió no incluirlos.

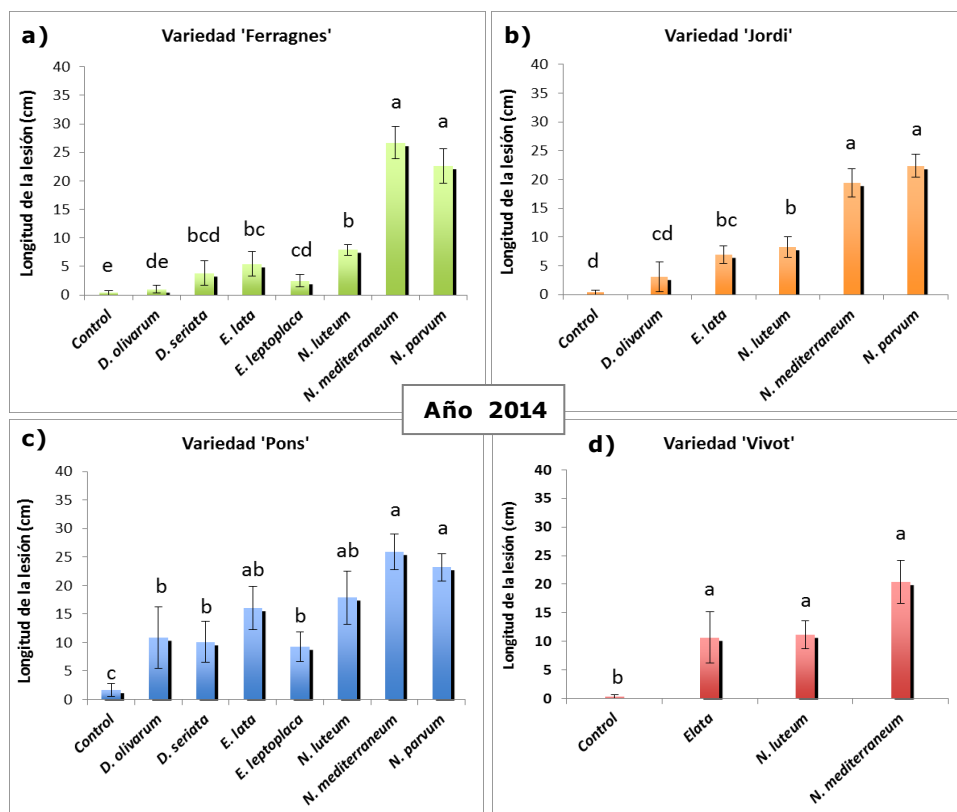
En todos los casos en los que se realizó reisolamiento fúngico se recuperó la especie inoculada, mientras que no se aisló ningún hongo de los árboles control.

El análisis mostró que existían diferencias significativas entre los dos años de estudio (2013 y 2014), de manera que los datos de cada año se analizaron por separado. Además, los datos no cumplían la homogeneidad de la

varianza (test de Levene:  $P < 0,05$ ; test de O'Brien:  $P < 0,05$ , test de Brown y Forsythe:  $P < 0,05$ ), por lo que se realizó su transformación a raíz cuadrada para realizar los análisis de varianza. Se obtuvo que la interacción variedad X hongo inoculado era significativa en los dos años de estudio, es decir, había un efecto del tratamiento dependiendo de la variedad de almendro inoculada. Por tanto, se muestran los datos por separado para cada variedad (Tabla 4.2, y Figuras 4.6 y 4.7).



**Figura 4.6.** Representación de la media de las longitudes (cm) de las lesiones internas causadas por especies de Botryosphaeriaceae y especies de Diatrypaceae en las cuatro variedades de almendro inoculadas en el año 2013. Dentro de cada variedad de almendro, las letras distintas indican que la existencia diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según análisis de menor diferencia significativa (M.D.S.) de las raíces cuadradas de la lesión causada por los hongos correspondientes. Las barras representan el error



**Figura 4.7.** Representación de la media de las longitudes (cm) de las lesiones internas causadas por especies de Botryosphaeriaceae y especies de Diatrypaceae en las cuatro variedades de almendro inoculadas en el año 2014. Dentro de cada variedad de almendro, las letras distintas indican que la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según análisis M.D.S. de las raíces cuadradas de la lesión causada por los hongos correspondientes. Las barras representan el error estándar.

### **Año 2013:**

En la Tabla 4.2. y en la Figura 4.6.a se observa que en la variedad de almendro 'Ferragnes', el primer año en que se realizó el ensayo (2013), el hongo *N. luteum* causó las lesiones necróticas internas de mayor longitud (media=52,51 cm), seguido de *N. parvum* (media=29,7 cm). En tercer lugar, de acuerdo a la longitud de las lesiones producidas, se encontraron los hongos *N. mediterraneum* (media=21,94 cm) y *E. lata* (media=17,49 cm), que no

mostraron diferencias significativas entre ellos. En cuarto lugar se encontró *D. seriata* (media=9,11 cm). Los hongos que causaron las lesiones de menor longitud en esta variedad fueron *E. leptoplaca* (media=4,79 cm) y *D. olivarum* (media=3,93 cm), sin diferencias significativas entre ellos. La media de las longitudes de las lesiones medidas en los árboles control, inoculados sólo con PDA, fue de 0,85 cm.

En el año 2013, *N. luteum* (media=33,45 cm) fue también el hongo que originó la lesiones de mayor longitud en la variedad de almendro 'Jordi'. De nuevo *N. parvum* (media=21,3 cm) y *N. mediterraneum* (media=16,65 cm) se encontraron en segundo lugar de acuerdo a la longitud de la lesión producida y sin mostrar diferencias significativas entre ellos. El hongo *D. seriata* (media=14,94 cm) se situó a continuación, con lesiones estadísticamente iguales a las generadas por *N. mediterraneum*. *E. lata* (media=10,54 cm) se posicionó a continuación y la longitud media de lesión fue significativamente distinta a la del resto de hongos, mientras que los hongos que produjeron las lesiones de menor longitud, al igual que en la variedad 'Ferragnes', fueron *D. olivarum* (media=5,56 cm) y *E. leptoplaca* (media=4,8 cm), sin diferencias significativas entre ellos. En los árboles control de la variedad 'Jordi' la media de las lesiones (2,05 cm) fue estadísticamente diferente al resto de grupos (Tabla 4.2 y Figura 4.6.b).

En la Tabla 4.2 y en la Figura 4.6.c se puede observar que en el primer año del ensayo, en la variedad 'Pons' el hongo *N. luteum* (media=53,38 cm) fue también el que causó las lesiones necróticas internas de mayor longitud, seguido de *N. mediterraneum* (media=21,41 cm) y *N. parvum* (media=19,62 cm), cuyas lesiones producidas no mostraron diferencias significativas entre ellos. En esta misma variedad, *E. lata* (media=9,56 cm), *D. olivarum* (media=7,08 cm) y *D. seriata* (media=10,48 cm), ocasionaron lesiones de longitud inferior que las generadas por *Neofusicoccum* spp. y no mostraron diferencias significativas entre ellos. Finalmente *E. leptoplaca* (media=4,92 cm) fue la especie que causó las lesiones de menor longitud, no mostrando diferencias significativas respecto al control (media=3,58 cm).



Los resultados del primer año en la variedad 'Vivot', mostraron también a *N. luteum* (media=56,56 cm) como el hongo que causó lesiones de mayor longitud. En segundo lugar se situaron *N. mediterraneum* (media=34,43 cm) y *E. lata* (media=28,70 cm), que no mostraron diferencias significativas. Las lesiones producidas por *N. parvum* (media=23,90 cm) y *D. seriata* (media=23 cm) no mostraron diferencias significativas con *E. lata*. Finalmente, se situaron *D. olivarum* (media=7,16 cm) y *E. leptopaca* (media=6,26 cm) como los hongos que causaron las lesiones de menor longitud. Esta variedad fue en la que todos los hongos produjeron las lesiones de mayor longitud el primer año, exceptuando *N. parvum*, que las produjo en la variedad 'Ferragnes'. La longitud de las lesiones en los árboles control (media=2,98 cm) no se mostraron significativamente diferentes a las causadas por *D. olivarum* (Tabla 4.2 y Figura 4.6.d).

De manera general para el año 2013 (Figura 4.6), se puede observar que *N. luteum* fue el hongo que causó las lesiones necróticas internas de mayor longitud en las cuatro variedades de almendro y, además, con diferencias significativas con cualquiera de las otras especies fúngicas inoculadas. Los siguientes hongos que causaron lesiones de mayores dimensiones de lesión fueron *N. parvum* y *N. mediterraneum*. En un grupo distinto se puede incluir *D. seriata* y *E. lata*, destacando este último en la variedad 'Vivot', con una media de la longitud de lesión por encima de la media de las originadas por *N. parvum* y sin diferencias significativas a la ocasionada por *N. mediterraneum*. En todas las variedades, *D. olivarum* y *E. leptoplaca* fueron los hongos que causaron las lesiones de menor longitud.

#### **Año 2014:**

En 2014, segundo año del ensayo, los resultados de las longitudes de las lesiones internas en la variedad 'Ferragnes' se pueden observar en la Tabla 4.2 y la Figura 4.7.a. En este caso, *N. mediterraneum* (media=26,7 cm) y *N. parvum* (media=22,6 cm) fueron los hongos que produjeron las lesiones de mayor longitud. Con lesiones de menor longitud y sin diferencias significativas, se

situaron *N. luteum* (media=7,92 cm), *E. lata* (media=5,4 cm) y *D. seriata* (media=3,83 cm). Finalmente, *E. leptoplaca* y *D. olivarum* fueron los hongos que produjeron las lesiones de menor longitud en esta variedad. El segundo año en los árboles control de la variedad 'Ferragnes' la media de las lesiones fue de 0,4 cm y estadísticamente diferente al resto de grupos (Tabla 4.2 y Figura 4.7.a).

En la variedad 'Jordi', en 2014, los hongos que causaron las lesiones de mayor longitud fueron *N. parvum* (media=22,35 cm) y *N. mediterraneum* (media=19,45 cm), no mostrando diferencias significativas entre ellos. Las lesiones producidas por *N. luteum* (media=8,25 cm) y *E. lata* (media=6,95 cm) también se mostraron estadísticamente iguales entre ellas. Mientras que el hongo *D. olivarum* (media=3,06 cm), que produjo las lesiones de menor longitud en esta variedad, no mostró diferencias significativas con *E. lata* ni con los árboles control (media=0,4 cm). Este segundo año de ensayo, en la variedad 'Jordi', debido a la muerte de algunos árboles por motivos ajenos al ensayo, no se obtuvieron datos suficientes de almendros inoculados con *D. seriata* y con *E. leptoplaca* por lo que no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico (Tabla 4.2 y Figura 4.7.b).

El segundo año del ensayo, en la variedad 'Pons', *N. mediterraneum* (media=25,9 cm) y *N. parvum* (media=23,2 cm) causaron las lesiones de mayor longitud. Sin diferencias significativas con ellos se encontraron *N. luteum* (media=17,86 cm) y *E. lata* (media=16 cm). Un tercer grupo estuvo formado por *D. olivarum* (media=10,83 cm), *D. seriata* (media=10,1 cm) y *E. leptoplaca* (media=9,25 cm), sin diferencias significativas entre ellos. En esta variedad la media de la lesión de los árboles control, en el ensayo de 2014, fue de 1,66 cm (Tabla 4.2 y Figura 4.7.c).

En la variedad 'Vivot' el año 2014, como se observa en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.7.d, las lesiones de mayor longitud las produjo el hongo *N. mediterraneum* (media=20,4 cm), aunque sin mostrar diferencias significativas con *N. luteum* (media=11,2 cm) y *E. lata* (media=10,66 cm). En esta variedad,

la muerte por motivos distintos a la inoculación de bastantes almendros ocasionó que no se dispusiera de datos suficientes para los hongos *D. olivarum*, *D. seriata*, *N. parvum* y *E. leptoplaca*.

En general, en el segundo año que se realizó el ensayo, se observó que *N. luteum* no fue el hongo que causó las lesiones de mayor longitud, como ocurrió el primer año. En cambio, las otras dos especies del género *Neofusicoccum* fueron las que causaron las lesiones de mayor longitud. Los hongos que causaron lesiones de menor longitud, cuando se disponía árboles suficientes para la evaluación, fueron *D. olivarum* y *E. leptoplaca*, sin diferencias significativas con *D. seriata* en las variedades 'Ferragnes' y 'Pons'.

En cuanto a la sensibilidad de las distintas variedades, se puede observar que en todas variedades los hongos inoculados se han mostrado como patógenos, exceptuando *E. leptoplaca* en la variedad 'Pons' en el año 2013, y *D. olivarum* en la variedad 'Vivot' en 2013 y en las variedades Ferragnes y 'Jordi' en 2014, ya que estos casos la longitud de las lesiones fue estadísticamente igual a la producida en los árboles control. Se puede observar también que en general la variedad 'Jordi' fue la menos sensible el primer año y que 'Vivot' y 'Ferragnes' lo fueron el segundo año (Tabla 4.2, y Figuras 4.6 y 4.7).

### IV.3 DISCUSIÓN.

Respecto a la patogenicidad de las especies de Botryosphaeriaceae en almendro, en el estudio de Inderbitzin *et al.* (2010) en California, en el que se inocularon almendros con *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. nonquaestium*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *M. pasheolina* y *Do. sarmentorum*, los hongos *N. parvum* y *N. nonquaestium* fueron los más virulentos. *N. parvum* presentó longitudes de lesión significativamente mayores a las producidas por *N. mediterraneum* y *D. seriata*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente ensayo, salvo en la variedad 'Vivot' el año 2013, en la que las lesiones producidas por *N. mediterraneum* fueron significativamente de mayor longitud que las producidas por *N. parvum*. Sin embargo, en el ensayo de Martos (2008)

de patogenicidad en almendro de las especies *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum* y *N. luteum*, *D. seriata* fue el hongo más virulento aunque sin mostrar diferencias significativas con los otros hongos. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, dado que *D. seriata* se ha mostrado poco virulento en todos los casos, mostrando diferencias significativas con los hongos más virulentos.

Las diferencias observadas en este ensayo de patogenicidad entre los dos años de estudio (2013 y 2014) podrían deberse en cierta medida a la falta de uniformidad y a un alto número de marras en el material vegetal inoculado el segundo año. Esto se produjo probablemente por el hecho de haber tenido que retirar un fragmento grande del tronco principal de los árboles inoculados el primer año para no dejar ningún síntoma de lesión interna. De este modo, para el segundo año algunos árboles quedaron muy bajos y, en bastantes casos no brotaron como se esperaba en primavera de 2014. En ellos el flujo de savia fue mermando por falta de brotes tirasavias de manera que muchos de esos árboles se fueron secando y muriendo, con lo que a pesar de haberlos inoculado en tejido interno sano, fue imposible realizar la evaluación al cabo de nueve meses. Es por este motivo que para algunas combinaciones variedad x hongo inoculado no se dispusieron de árboles suficientes para realizar el análisis estadístico y no aparecen los valores correspondientes en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.7.

En cualquier caso, los resultados de ambos años permiten observar que, en general, las especies de *Neofusicoccum* fueron los hongos que produjeron las mayores lesiones, mientras que *D. seriata* y *E. lata*, mostraron lesiones intermedias, y *D. olivarum* y *E. leptoplaca* fueron los hongos que en general ocasionaron las lesiones de menor longitud.

En referencia a los resultados obtenidos con *N. luteum* durante el primer año de ensayo, en el que se mostró como el hongo que produjo las lesiones de mayor longitud en las cuatro variedades ensayadas, hay que indicar que, en el trabajo de Martos (2008) ya se había demostrado la patogenicidad de este hongo en almendro. Además, *N. luteum* es una de las especies que se aíslan con

frecuencia en vid con síntomas de chancros y decaimiento (Van Niekerk *et al.*, 2004, Luque *et al.*, 2009, Úrbez-Torres y Gubler 2009, Chebil *et al.*, 2014). Coincidiendo con los resultados del presente ensayo, *N. luteum*, junto a *N. parvum*, fueron las especies que se mostraron más virulentas en los ensayos de patogenicidad en vid realizados por Úrbez-Torres y Gubler (2009) en California, por Luque *et al.* (2009) en Cataluña y por Billones *et al.* (2014) en Nueva Zelanda.

La patogenicidad de *N. mediterraneum*, que como ya hemos visto, fue junto a *N. parvum* el hongo que causó las lesiones de mayor longitud el segundo año de ensayo, había sido demostrada en California en almendro (Inderbitzin *et al.*, 2010) y vid (Úrbez-Torres *et al.*, 2010) y en España en vid (Martín *et al.*, 2011; Pintos *et al.*, 2011a). En olivo, Moral *et al.* (2010) inocularon ramas y frutos inmaduros con *B. dothidea*, *D. seriata* y *N. mediterraneum*, mostrándose éste último como el hongo más virulento en los dos tipos de tejido.

*D. olivarum* es una especie descrita recientemente que ha sido aislada en Italia en olivo (Lazziera *et al.*, 2008a), algarrobo (Granata *et al.*, 2013) y vid (Linedaddu *et al.*, 2015). Sin embargo, sólo se han llevado a cabo ensayos de patogenicidad en algarrobo, aunque en este caso sólo en comparación con un control y no con otras especies fúngicas. En nuestros ensayos, la patogenicidad de este hongo en almendro ha mostrado resultados variables, dado que en 2013 en la variedad 'Vivot' la media de longitud de la lesión no mostró diferencias significativas respecto al control, mientras que en 2014 sólo en la variedad 'Pons' se obtuvieron diferencias significativas respecto al control.

Respecto a la patogenicidad de hongos de la familia Diatrypaceae, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos en estudios previos publicados por Carter (1982) y Rumbos (1985), los cuales demostraron la patogenicidad de *E. lata* en almendro. En nuestro ensayo, en las cuatro variedades de almendro estudiadas y en los dos años del ensayo, *E. lata* produjo lesiones significativamente distintas a las de los árboles control. Por su parte, Trouillas y Gubler (2010) demostraron la patogenicidad de *E. leptoplaca*

en vid en California. Posteriormente, Pitt *et al.* (2013) realizaron un ensayo de patogenicidad con ocho especies de Diatrypaceae en vid en Australia, incluyendo *E. leptoplaca*. En dicho estudio compararon las longitudes de las lesiones producidas, así como la extensión de la infección. Para ello realizaron aislamientos de zona la asintomática, más allá del límite de la lesión. *E. leptoplaca* se situó en tercer lugar respecto al tamaño de la lesiones y la distancia de reisolamiento, sólo por detrás de *E. lata* y *Cryptovalsa ampelina* (Nitschke) Fuckel. Sin embargo, en el estudio que aquí se presenta, *E. leptoplaca* ha sido el hongo que produjo las lesiones de menor longitud ambos años en todas las variedades, excepto en 'Ferragnes', en la que fue *D. olivarum*.

V. Patogenicidad de *Collophora hispanica*, *Pleurostomophora richardsiae* y *Phaeoacremonium* spp. en almendro

---





# V. PATOGENICIDAD DE *COLLOPHORA HISPANICA*, *PLEUROSTOMOPHORA RICHARDSIAE*, Y *PHAEOACREMONIUM SPP.* EN ALMENDRO

---

En las prospecciones de hongos patógenos de la madera en almendros en la isla de Mallorca, además de hongos de las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae, cuya patogenicidad en almendro se abordó en el Capítulo anterior, también se encontraron algunas especies pertenecientes a los géneros *Collophora*, *Phaeoacremonium* y *Pleurostomophora*. Todas ellas han sido asociadas a enfermedades de madera en otros huéspedes, principalmente la vid (Mostert *et al.*, 2006; Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2009b, 2014b, 2015; Rolshausen *et al.*, 2010), pero nunca hasta ahora en almendro. Por ello, se realizó un ensayo de patogenicidad con algunos aislados de estas especies fúngicas para determinar su patogenicidad en este cultivo.

## **V.1. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### V.1.1. MATERIAL VEGETAL.

En el ensayo se realizó inoculando plantones de almendro de dos años de edad de la variedad 'Ferragnes', injertadas sobre el portainjerto GxN Garnem® C-14 (*P. dulcis* x *P. persica*), que se mantuvieron en un invernadero de cristal a 10-20 °C durante la toda la duración del ensayo. Los almendros se plantaron en macetas de poliuretano de 20 cm con turba previamente esterilizada en autoclave. Durante el ensayo los almendros se regaron 1-2 veces por semana.

V.1.2. AISLADOS FÚNGICOS.

Se utilizaron 11 aislados fúngicos de las especies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* y *P. richardsiae* (Tabla 5.1), todos ellos obtenidos en las prospecciones de hongos patógenos de la madera en almendros (Capítulo III de la Tesis).

**Tabla 5.1.** Especies, códigos, localización y año de aislamiento de los aislados utilizados en el ensayo de patogenicidad.

Especie	Aislados	Parcela	Localización	Año
<i>Collophora hispanica</i>	Col-1,	2	Sant Llorenç des Cardassar	2010
	Col-3,	2	Sant Llorenç des Cardassar	2010
	Col-8.4.2	27	Binissalem	2013
	Col-9.1.6	28	Sencelles	2013
<i>Phaeoacremonium amygdalinum</i>	Psp-2	1	Sant Llorenç des Cardassar	2009
	Psp-3,	1	Sant Llorenç des Cardassar	2009
<i>Phaeoacremonium iranianum</i>	Pir-1	1	Sant Llorenç des Cardassar	2009
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Pri-1.3	2	Sant Llorenç des Cardassar	2011
	Pri-2	2	Sant Llorenç des Cardassar	2011
	Pri-6.2.1.2	25	Santa María	2013
	Pri.9.2	15	Santa María	2012

V.1.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

Se inocularon seis plantones para cada uno de los 11 aislados y 6 plantones para los controles que, después de la inoculación, se colocaron en el invernadero con una distribución totalmente al azar. El experimento se realizó por duplicado.

#### V.1.4. INOCULACIÓN.

Las inoculaciones se realizaron en octubre de 2013. Para inocular los hongos se realizaron heridas en el tronco principal de los almendros, entre los dos entrenudos superiores con un sacabocados de 5 mm e inmediatamente se colocó el inóculo, consistente en discos de agar y micelio del mismo diámetro y se selló con Parafilm® (Fig. 5.1). Los discos se obtuvieron a partir de la zona de avance (crecimiento activo) de colonias de los hongos cultivados en medio de cultivo MEAS. Como controles se usaron discos de MEAS estéril.

#### V.1.5. EVALUACIÓN.

Transcurridos seis meses tras la inoculación, los almendros fueron retirados y trasladados a laboratorio para, descortezando previamente con una cuchilla, observar el desarrollo de las lesiones internas a partir del punto de inoculación. Se midió la extensión de la necrosis interna tanto hacia arriba como hacia abajo desde el punto de inoculación, restando al valor obtenido el diámetro del sacabocados. Además se sembraron cinco pequeños fragmentos (de 0,5 a 1 cm) de tejido necrótico del borde de cada lesión en medio de cultivo (MEAS) identificándose los hongos obtenidos como se describe en la bibliografía (Vijaykrishna *et al.*, 2004; Mostert *et al.*, 2006).



**Figura 5.1.** Proceso de inoculación. a) Colocación del disco de medio de cultivo con el hongo, b) Sellado con Parafilm® y c) Disposición de los almendros al azar en el invernadero donde se realizó el ensayo.

#### V.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Con los datos de longitud de la lesión se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el Modelo Lineal General (GLM) de SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0, SAS Institute Inc, Cary, NC, EE. UU.). Los factores considerados en el modelo fueron: experimento (realizado dos veces), patógeno y aislado anidado en patógeno (cuatro aislamientos para *C. hispanica* y *P. richardsiae*, dos aislados para *Pm. amygdalinum* y un aislado de *Pm. iraninanum*). Las medias se compararon mediante el valor menor diferencia significativa (M.D.S.) a  $P = 0,05$ .

#### V.2. RESULTADOS.

No se observaron diferencias significativas en los datos de la longitud de la lesión entre los dos experimentos ( $P = 0,8773$ ), pero el efecto del tratamiento fue significativo ( $P < 0,05$ ). No hubo diferencias entre los aislados dentro de cada especie ( $P = 0,9869$  para *Pm. amygdalinum*;  $P = 0,2273$  para *C. hispanica*;  $P = 0,5996$  para *P. richardsiae*), por lo que se combinaron los datos de los aislados dentro de las especies. Las medias de la longitud de las necrosis internas en almendros de la variedad 'Ferragnes' 6 meses después de la inoculación se muestran en la Tabla 5.2. y en la Figura 5.3.

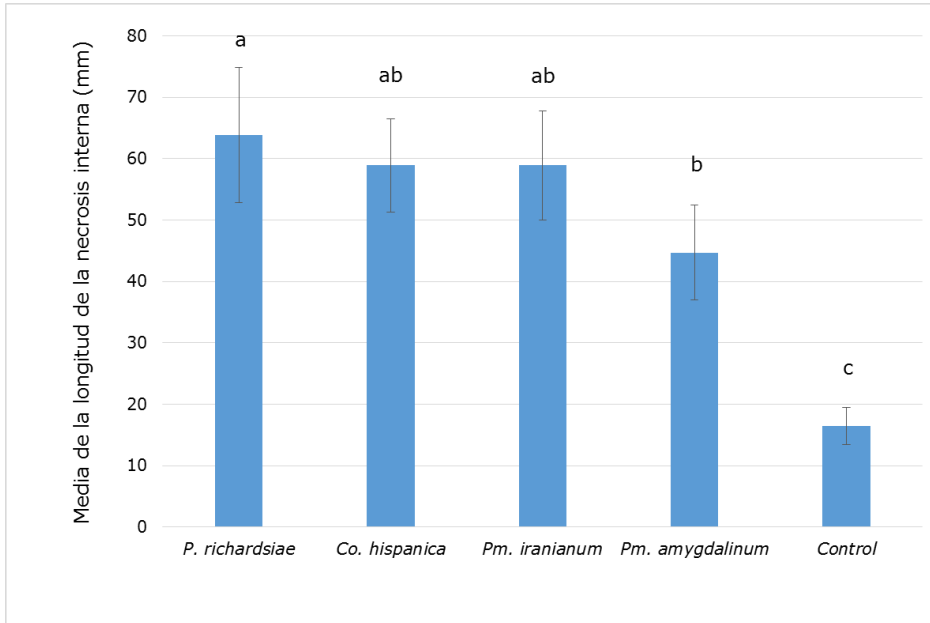


**Figura 5.2.** Necrosis interna en almendros de la variedad 'Ferragnes' causada 6 meses después de la inoculación con 4 aislados de *C. hispanica*: Col-1 (1), Col-3 (2), Col-8.4.2 (3) y Col-9.1.6 (4); 2 aislados de *Pm. amygdalinum*: Psp-2 (5) y Psp-3 (6); un aislado de *Pm. iranianum*: Pir-1 (7); 4 aislados de *P. richardsiae*: Pri-2 (8), Pri-9.2 (9), Pri-1.3 (10) y Pri-6.2.1.2 (11); y el control con PDA (12).

**Tabla 5.2.** Longitudes medias de las necrosis (mm) y su error estándar generadas por cada aislado y especie ensayados 6 meses después de la inoculación de almendros de la variedad 'Ferragnes'.

Especie	Aislado	Media de la lesión <sup>a</sup> (mm) ± Error estándar, para cada aislado	Media de la lesión (mm) ± Error estándar para cada especie
<i>Collophora hispanica</i>	Col-1,	69.1 ± 7.7	58.9 ± 7.6
	Col-3,	62.6 ± 6.7	
	Col-8.4.2	58.5 ± 11.3	
	Col-9.1.6	59.9 ± 4.9	
<i>Phaeoacremonium amygdalinum</i>	Psp-2	44.6 ± 7.2	44.7 ± 7.7
	Psp-3,	44.8 ± 8.1	
<i>Phaeoacremonium iranianum</i>	Pir-1	58.9 ± 8.9	58.9 ± 8.9
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	Pri-1.3	57.9 ± 11.2	63.8 ± 11
	Pri-2	55.2 ± 13.2	
	Pri-6.2.1.2	67.2 ± 7.5	
	Pri.9.2	74.8 ± 11.9	
Control		16.5± 3.03	16.5± 3.03

<sup>a</sup>Media de 2 experimentos de 6 almendros inoculados por aislado.



**Figura 5.3.** Representación de la media de la longitud de la necrosis interna causada por cuatro especies fúngicas en almendros de la variedad 'Ferragnes' seis meses después de la inoculación. La media se basa en 12 replicas por aislado (cuatro aislados para *C. hispanica* y *P. richardsiae*, 2 aislados para *Pm. amygdalinum* y un aislado para *Pm. iranianum*). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), las barras representan el error estándar.

Todos los aislados causaron necrosis internas en la madera que se desarrollaron hacia arriba y hacia abajo desde el punto de la inoculación (Tabla 5.2. y Figura 5.2.). Observando los datos de cada aislado individualmente, el aislado Pri-9.2 de la especie *P. richardsiae* fue el que provocó la mayor longitud de lesión (media=74,9 mm), mientras que el aislado Psp-2 de *Pm. amygdalinum* fue el que causó las lesiones de menor tamaño (media=44,6 mm). Igualmente, al combinar los datos dentro de cada especie, se observó que, en conjunto, la especie *P. richardsiae* provocó las lesiones de mayor longitud (media=63,7 mm) y la especie *Pm. amygdalinum* provocó las lesiones de menor tamaño (media=44,7 mm).

Estos resultados de estas inoculaciones mostraron que las especies *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *C. hispanica* y *P. richardsiae* causaron necrosis interna en la madera de los almendros significativamente mayores que las observadas en las plantas control.

Las especies inoculadas se aislaron de las lesiones, identificándolas por la morfología de las colonias y los conidios, confirmándose los postulados de Koch. Sin embargo, no se aislaron estos hongos en las plantas control.

### **V.3. DISCUSIÓN.**

Los resultados de este ensayo confirman que estos hongos deben ser considerados como patógenos de la madera en almendros.

La mayoría de las citas de hongos del género *Phaeoacremonium* como fitopatógenos hacen referencia al cultivo de la vid (Mostert *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2009b, 2015) y la mayoría de los ensayos de patogenicidad con especies de este género se han realizado con la especie *Pm. minimum*, ya que ésta es la más común en vid. No obstante, también se han citado especies de *Phaeoacremonium* en otros huéspedes. En concreto, de las 46 especies descritas hasta ahora, hay 25 especies que se han asociado con síntomas de enfermedades en hospedantes distintos a la vid (Gramaje *et al.*, 2015). *Phaeoacremonium iranianum*, que se ha encontrado como patógeno en vid en varios países como Canadá (Úrbez-Torres *et al.*, 2014), Italia (Essakhi *et al.*, 2008), Irán (Mostert *et al.*, 2006), Sudáfrica (White *et al.*, 2011) y España (Gramaje *et al.* 2009a), también se ha encontrado afectando a kiwis en Italia (Mostert *et al.*, 2006), albaricoques (Mostert *et al.*, 2006), perales (Cloete *et al.*, 2011) en Sudáfrica y manzanos en Irán (Arzanlou *et al.*, 2014).

*Collophora* fue propuesto como nuevo género por Damm *et al.* (2010) para incluir en él varios hongos con fases conidiales semejantes a las del género *Lecythophora*. Entre estos hongos estaba *C. rubra*, una especie frecuente en madera necrótica de almendros en Sudáfrica (Damm *et al.*, 2010). Estos mismos

autores inocularon cinco especies de *Collophora* en albaricoque, melocotonero y ciruelo, confirmándose la patogenicidad sólo en algunas combinaciones hongo-planta; estas fueron *C. africana* y *C. rubra* en albaricoquero, *C. parla* en ciruelo, *C. pallida* en melocotonero y albaricoquero. En las prospecciones realizadas en esta Tesis, se encontró la nueva especie, *C. hispanica*, que se aisló de los puntos y estrías necróticas del tejido del xilema de algunas de las muestras de almendro, demostrándose además con esta Tesis su patogenicidad respecto al almendro.

*P. richardsiae* como patógeno sólo se había encontrado en vid en California (Rolshausen *et al.*, 2010), en Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2007) y olivo en Italia, donde además, como en nuestro caso, resultó ser el hongo más agresivo de los estudiados (Carlucci *et al.*, 2013).

*C. hispanica*, *P. richardsiae*, *Pm. amygdalinum* y *Pm. iranianum* son especies de crecimiento lento, que probablemente han sido a menudo excluidas de los resultados de las prospecciones de hongos en las plantas leñosas. Un escenario similar ya ocurrió con el hongo patógeno de vid *Cadophora luteo-olivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew. Esta especie fue citada por primera vez en material de plantación de vid aparentemente sano en Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2003) y, desde entonces, ha sido encontrada afectando a vides en todo el mundo (Gramaje *et al.*, 2014b). Por tanto, se debe prestar más atención a la presencia de estas especies relativamente desconocidas en muestras de plantas leñosas que presenten síntomas de decaimiento, considerando su papel como agentes patógenos asociados con enfermedades de la madera.



## **VI.** Evaluación de fungicidas para la protección de heridas de poda frente a la infección por especies de Botryosphaeriaceae en almendro

---



# VI. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA LA PROTECCIÓN DE HERIDAS DE PODA FRENTE A LA INFECCIÓN POR ESPECIES DE BOTRYOSPHAERiaceae EN ALMENDRO

---

Hasta el momento no se han realizado estudios sobre el control de patógenos fúngicos asociados a las enfermedades de la madera en almendro. No obstante, como ya se ha comentado en capítulos anteriores, estas enfermedades y su control han sido estudiados en otros cultivos como la vid (Van Niekerk *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2009; Úrbez-Torres y Gubler, 2009), cítricos (Eskalen *et al.*, 2011), olivo (Moral *et al.*, 2010; Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Carlucci *et al.*, 2013) o aguacate (Twizeyimana *et al.*, 2013). En este sentido, dado que se ha postulado que una de las principales vías para las infecciones por hongos causantes de enfermedades de la madera es a través de las heridas de poda (Mostert *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2008; Trouillas y Gubler, 2010; Úrbez-Torres y Gubler, 2011; Díaz y Latorre, 2013; Baskarathevan *et al.*, 2013; Agustí-Brisach *et al.*, 2015; Gramaje *et al.*, 2015), un objetivo principal de las estrategias de control es la protección de dichas heridas. Si nos centramos en los hongos de la familia Botryosphaeriaceae, Pitt *et al.* (2012) y Twizeyimana *et al.* (2013) llevaron a cabo estudios tanto *in vitro* como en condiciones de campo para evaluar la eficacia de diversos fungicidas aplicados sobre heridas de poda en el control de enfermedades causadas por hongos de esta familia en vid y en aguacate respectivamente. En ambos estudios se obtuvieron resultados satisfactorios con algunos de los fungicidas ensayados.

Dados estos antecedentes, en este Capítulo se presenta un estudio sobre la protección de las heridas de poda en almendro frente a la infección causada por hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, el grupo de hongos patógenos más frecuente en los resultados de las prospecciones de campo (Capítulo III). En la primera parte del trabajo se evalúa la eficacia *in vitro* de 10 materias activas fungicidas respecto al crecimiento micelial de cuatro especies fúngicas de la familia Botryosphaeriaceae. En la segunda fase, se lleva a cabo un ensayo consistente en evaluar el potencial de algunos de esos fungicidas aplicados a heridas de poda en almendros, para determinar su eficacia en el control de las infecciones.

## VI.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

### VI.1.1. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS *IN VITRO*.

#### VI.1.1.1. Cultivos fúngicos.

Para este ensayo se eligió un aislado de cada una de las siguientes especies: *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*. En la Tabla 6.1. se muestran los aislados elegidos, indicándose su origen y año de aislamiento. Los aislados se conservaron a -80 °C en la colección del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia (IAM-UPV).

**Tabla 6.1.** Aislados y origen de las especies de hongos que se eligieron para el ensayo de control.

<b>Especie</b>	<b>Código del aislado</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Parcela origen</b>	<b>Municipio (Comarca)</b>
<i>Diplodia seriata</i>	BAL-10	2014	27	Binissalem (Es Raiguer)
<i>Neofusicoccum luteum</i>	BAL-30	2014	32	Llucmajor (Migjorn)
<i>N. mediterraneum</i>	BAL-3	2010	2	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)
<i>N. parvum</i>	BAL-7	2012	6	Sant Llorenç des Cardassar (Llevant)

VI.1.1.2. Fungicidas.

Se seleccionaron 10 materias activas fungicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos. En la Tabla 6.2. se muestran las características de los productos elegidos.

**Tabla 6.2.** Características de los fungicidas utilizados en el ensayo de evaluación *in vitro*.

<b>Materia activa</b>	<b>Grupo químico<sup>1</sup></b>	<b>Modo de acción<sup>1</sup></b>	<b>Diana<sup>1</sup></b>	<b>Producto comercial - Fabricante</b>	<b>Riqueza (%)</b>	<b>Formulación<sup>2</sup></b>
Oxicloruro de Cobre	Inorgánicos-Cobre y Derivados	Actividad de contacto y multidiana (M)	Multidiana	Cuprosan-Alinta	50	WP
Ciproconazol	Triazoles	Actividad de contacto y multidiana (M)	Multidiana	Caddy Pepite-Bayer	10	WG
Tebuconazol				Folicur-Bayer	25	WG
Captan	Ftalimidas	Actividad de contacto y multidiana (M)	Multidiana	Karnak-Lainco	85	WP
Folpet				Folpec-Sapec Agro	50	WP
Mancozeb	Ditiocarbamatos	Actividad de contacto y multidiana (M)	Multidiana	Micene-Sipcam Inagra	80	WP
Tiram				Deepest-Lainco	50	SC
Piraclostrobin	Estrobilurinas	Respiración (C)	Complejo III-citocromo bc-1 (ubiquinol oxidasa) en diana Q <sub>o</sub>	Cabrio-BASF	25	EC
Boscalida	Piridincarboxamidas	Respiración (C)	Complejo II-succinato deshidrogenasa	Cantus-BASF	50	WG
Metil tiofanato	MBC-tiofanatos	Mitosis y división celular	Ensamblaje de la β-tubulina en la mitosis	Cercobin-Certis	45	SC

1 Según F.R.A.C. (Anónimo, 2003).

2 WG: gránulos dispersables en agua, EC: emulsión concentrada, SC: suspensión concentrada; WP, polvo mojable.

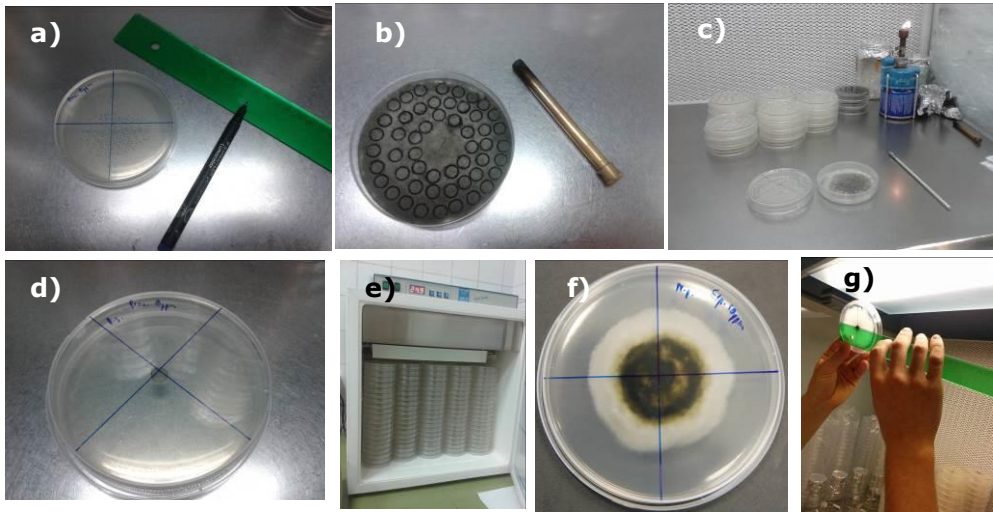
Los fungicidas se disolvieron en agua y se añadieron a medio de cultivo PDA previamente esterilizado y enfriado a 45-50 °C. Para cada fungicida se prepararon cinco concentraciones [0 (control),  $10^{-1}$ , 1, 10, y  $10^2$  mg de materia activa por litro]. El medio de cultivo con las diferentes concentraciones de fungicida se volcó en placas Petri de 90 mm de diámetro, donde se dejó solidificar. Finalmente, se trazaron dos ejes diametrales perpendiculares sobre cada una de las placas.

#### VI.1.1.3. Diseño del experimento.

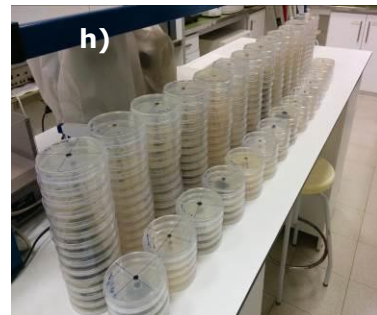
A partir de placas de PDA incubadas a 25 °C y colonizadas con los aislados elegidos (Tabla 6.1.), se extrajeron discos de 8 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados. Estos discos de micelio se sembraron en el centro de las placas de PDA a las que se habían añadido previamente las distintas concentraciones de fungicidas y, también, a las placas control sin fungicida. Se inocularon cuatro placas por cada combinación especie fúngica / fungicida / concentración. Una vez sembradas, las placas se incubaron a 25 °C con fotoperíodo 12h luz / 12 h oscuridad, revisándose cada día su crecimiento. El ensayo se realizó por duplicado.

#### VI.1.1.4. Lectura de resultados y cálculo de la CE<sub>50</sub>.

La lectura de resultados se realizó cuando en las placas control las colonias fúngicas alcanzaron aproximadamente el 90 % de la totalidad del diámetro de las mismas. En ese momento se midieron los dos diámetros de cada colonia coincidentes con las líneas trazadas en las placas.



**Figura 6.1.** Detalle del proceso de cultivo en medio PDA con fungicida: a) marcado de las placas, b) preparación de los discos de micelio, c) siembra de los discos en el medio de cultivo, d) hongo sembrado en la placa marcada, e) incubación en cámara de cultivo, f) hongo cultivado (*N. parvum* en medio de cultivo toxicado con ciproconazol a 10 ppm. a los cuatro días de incubación), g) medición del crecimiento miceliar, h) disposición de placas correspondientes a 3 fungicidas antes de la medición.



La concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de un fungicida respecto al crecimiento miceliar es la concentración que reduce en un 50% el crecimiento del micelio respecto al control. Para obtener las CE<sub>50</sub> de los fungicidas de nuestro ensayo, en primer lugar se calculó la media de los dos diámetros medidos en cada placa y a este valor se le descontó el diámetro del disco sembrado, 8 mm. Dividiendo el resultado por el número de días desde la siembra se obtuvo el crecimiento miceliar diario y éste se expresó como porcentaje respecto al control (concentración 0). Luego se calcularon rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) de cada una de las 4 repeticiones x 2 réplicas de cada combinación hongo x fungicida a partir de la transformación probit de los porcentajes (eje Y) y el logaritmo en base 10 para las concentraciones (eje x). De esta manera la CE<sub>50</sub> se calculó



como el antilogaritmo de la concentración resultante para una  $y = 5,00$  que es el valor *probit* para un 50%.

#### VI.1.1.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos de las  $CE_{50}$ , se realizó mediante un análisis de varianza con el programa Statistix 10.0.

### VI.1.2. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS *IN PLANTA*.

#### VI.1.2.1. Material vegetal.

Para la realización de este experimento se utilizaron 288 plantones de almendro de tres años de edad del cultivar 'Ferragnes' injertados sobre patrón híbrido GxN (Garnem) C-14. Éstos tenían una altura de entre 70 cm y 80 cm y estaban plantados en contenedores de plástico de 2 litros de capacidad.

#### VI.1.2.2. Fungicidas.

Para el ensayo de tratamiento de heridas de poda se eligieron los siguientes fungicidas: tebuconazol y piraclostrobin, por ser los más efectivos en la reducción del crecimiento micelial; boscalida y metil tiofanato por mostrar un buen resultado, aunque sólo frente a algunos de los hongos ensayados; y mancozeb que, aunque no mostró buenos resultados *in vitro*, es un fungicida del grupo de los ditiocarbamatos muy usado habitualmente en campo para control de otras enfermedades fúngicas.

#### VI.1.2.3. Especies fúngicas inoculadas y preparación del inóculo.

Se utilizaron los mismos aislados fúngicos que en el ensayo *in vitro* (Tabla 6.1.). El inóculo se preparó en frascos de cristal con 500 ml de medio de cultivo de caldo de patata y Dextrosa al 2,6 % (PDB; Conda-Pronadisa, Madrid,

España), introduciendo en cada uno de ellos 6-7 fragmentos de micelio (0,5 x 0,5 mm) de los cultivos en PDA de los hongos e incubándolos a 25 °C durante 4 días para obtener una cantidad de micelio suficiente. Posteriormente, se preparó el inóculo siguiendo la metodología descrita por Twizeyimana *et al.* (2013). Con una batidora se trituró la suspensión de micelio para homogeneizar el contenido por todo el recipiente. Para cada especie fúngica, la suspensión de micelio se ajustó a una concentración de  $3 \times 10^4$  fragmentos de micelio/ml en un frasco con 200 ml con agua estéril mediante una cámara de recuento Thoma.

#### VI.1.2.4. Tratamiento de las heridas de poda e inoculación de los patógenos.

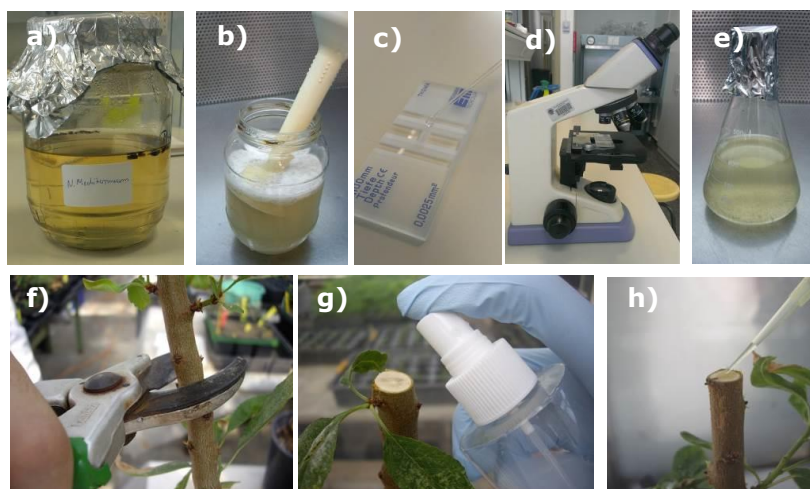
Se podó el tronco principal de los almendros y se aplicaron inmediatamente los fungicidas a los cortes. Posteriormente, se inocularon los cortes tratados con una suspensión de fragmentos de micelio de los hongos. La inoculación se llevó a cabo en dos momentos diferentes, uno y siete días después del corte y aplicación del fungicida, siguiendo la metodología de Twizeyimana *et al.* (2013). El experimento se realizó en un invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia, realizando 3 cortes (repeticiones) por combinación de hongo y fungicida. Eso supuso un total de 120 cortes, uno por planta. El ensayo se replicó dos veces. Además, se inocularon 3 controles, sin tratar con fungicida, para cada uno de los hongos, tiempos de inoculación (uno y siete días tras el corte) y cada réplica del ensayo.

Antes de la realización de los cortes de poda se prepararon 5 pulverizadores manuales con un volumen de 180 ml, uno por cada fungicida. Se utilizó la concentración recomendada para cada fungicida: boscalida (0,12%), mancozeb (0,3%), metil tiofanato (0,15%), piraclostrobin (0,04%) y tebuconazol (0,075%).

Los cortes de poda se realizaron en octubre de 2014, con tijeras de podar y se aplicaron los fungicidas inmediatamente tras el corte. Al día siguiente se inocularon los cortes de poda de los almendros del primer momento de

inoculación con un volumen de 100µl de inóculo aplicados con una micropipeta. La segunda inoculación se realizó siete días después de realizar los cortes de poda. Los cortes se sellaron mediante cinta Parafilm® sólo usto después de cada una de las inoculaciones. En ambas fechas también se inocularon los controles sin tratar.

Una vez realizada la inoculación los almendros se mantuvieron cinco meses en el invernadero hasta su evaluación.



**Figura 6.2.** Detalles del ensayo de la evaluación de fungicidas en heridas de poda. a) cultivo en medio líquido (PDB); b) preparación del inóculo; c), d) ajuste de la concentración del inóculo mediante cámara de Thoma; e) Erlenmeyer con inóculo a concentración  $3 \times 10^4$  fragmentos de micelio/ml; f) y g) práctica de la de poda y tratamiento con fungicida de la misma; h) inoculación.

#### VI.1.2.5. Lectura de resultados.

El efecto de los fungicidas sobre la infección causada por los hongos se evaluó mediante dos parámetros: 1) la longitud de la lesión interna producida y 2) el porcentaje de reislamiento de los hongos. Para ello, transcurridos cinco meses tras la inoculación, se cortaron fragmentos de rama por debajo de las lesiones producidas y se llevaron al laboratorio, donde se descortezaron para

medir la longitud de la lesión interna y se procedió al aislamiento de hongos a partir de la zona límite de la lesión (Figura 6.3.). Los aislamientos se realizaron en medio de cultivo PDAS con la metodología descrita en el Capítulo III, se realizaron sembrándose 7 pequeños fragmentos de la zona necrosada por muestra. Las placas se incubaron a 25 °C y se revisaron regularmente hasta que se apreció crecimiento fúngico, comprobando por sus características morfológicas si se trataba de los hongos inoculados. Regularmente se elegían algunos de estos aislados para comprobar su identificación a nivel de especie mediante las técnicas moleculares descritas en el Capítulo III. Se calculó el porcentaje de fragmentos de aislamiento positivos sobre el total de fragmentos de aislamiento sembrados para cada planta.



**Figura 6.3.** Fragmento del tronco de uno de los almendros inoculados, descortezado parcialmente para realizar la evaluación del ensayo: medición de la longitud de la lesión y realización de reaislamientos. La flecha indica la zona límite de la lesión, a partir de la cual se realizaban los aislamientos.

### VI.1.2.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza con el programa Statistix 10.0. Para el porcentaje de reaslamiento, se realizó la transformación arcoseno ( $\arcsen(Y/100)^{1/2}$ ) con el objetivo de mejorar la heterogeneidad de las varianzas y lograr que los datos se ajustaran a una distribución normal.

## VI.2. RESULTADOS.

### VI.2.1. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS *IN VITRO*.

La Tabla 6.3. muestra los valores medios de la CE<sub>50</sub> para cada combinación fungicida/hongo estudiada.

**Tabla 6.3.** Valores CE<sub>50</sub> de distintos fungicidas para la inhibición del crecimiento micelial de *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*.

Fungicida	Valores medios de CE50 (mg de materia activa / l) <sup>a</sup>								
	<i>D. seriata</i>		<i>N. luteum</i>		<i>N. mediterraneum</i>		<i>N. parvum</i>		M.D.S. <sup>1</sup>
Boscalida	40,04	B c <sup>b</sup>	0,34	A a	>100	C d	6,86	A ab	21,12
Captan	21,04	A b	64,25	B c	45,66	B b	3,83	A ab	19,92
Ciproconazol	1,89	B a	0,27	A a	0,79	AB a	4,32	C ab	1,53
Folpet	44,43	A c	66,96	B c	81,38	B c	40,91	A d	19,31
Mancozeb	7,05	A ab	37,16	B b	80,97	C c	22,88	AB c	23,37
Metil Tiofanato	0,67	A a	8,33	B a	0,65	A a	0,77	A a	1,80
Oxicloruro de Cobre	78,03	AB d	92,72	B d	82,38	AB c	65,38	A e	20,79
Piraclostrobin	0,09	A a	0,05	A a	0,99	B a	0,10	A a	0,26
Tebuconazol	0,15	AB a	0,09	A a	0,21	BC a	0,25	C a	0,09
Tiram	25,63	A bc	13,81	A a	56,65	B b	15,76	A bc	21,18
M.D.S. <sup>2</sup>	18,96		15,86		15,72		12,05		

<sup>a</sup> Valores medios de la CE<sub>50</sub> (mg de materia activa/l).

<sup>b</sup> Menor diferencia significativa: medias seguidas por distinta letra difieren significativamente (P<0,05). Letras mayúsculas son para la comparación de medias de la misma fila. Letras minúsculas son para la comparación de medias de la misma columna.

M.D.S.0,05(1) es para la comparación de medias entre patógenos con el mismo fungicida.

M.D.S.0,05(2) es para la comparación de medias entre fungicidas con el mismo patógeno.

(M.D.S.: Menor diferencia significativa)

En general, los fungicidas más efectivos en la inhibición de crecimiento miceliar para todas las especies de Botryosphaeriaceae ensayadas fueron tebuconazol con valores medios de CE<sub>50</sub> comprendidos entre 0,09 y 0,25 mg de materia activa (m. a.) por litro, y el piraclostrobin con valores medios entre 0,05 y 0,99 mg de m. a./l. A continuación de éstos, el ciproconazol resultó muy efectivo para la reducción de crecimiento miceliar de todas las especies con valores medios de CE<sub>50</sub> comprendidos entre 0,27 y 1,89 mg de m. a./l, exceptuando el caso de *N. parvum*, para el que el valor medio de la CE<sub>50</sub> fue de 4,32 mg de m. a./l. El fungicida metil tiofanato, también se mostró efectivo, obteniéndose valores medios comprendidos entre 0,65 y 0,77 mg de m. a./l, a excepción de la especie *N. luteum*, para la que el valor medio de la CE<sub>50</sub> con este fungicida fue de 8,33 mg de m. a./l.

Para el hongo *D. seriata*, los fungicidas más efectivos fueron el piraclostrobin (media de CE<sub>50</sub>=0,09 mg de m. a./l), el tebuconazol (media de CE<sub>50</sub>=0,15 mg de m. a./l), el metil tiofanato (media de CE<sub>50</sub>=0,67 mg de m. a./l) y el ciproconazol (media de CE<sub>50</sub>=1,87 mg de m. a./l). Sin mostrar diferencias significativas con los fungicidas anteriores, se encontró el mancozeb (media de CE<sub>50</sub>=7,05 mg de m. a./l). Los fungicidas captan y tiram ambos con media de CE<sub>50</sub>> 20 mg de m. a./l se mostraron poco efectivos, al igual que el mancozeb y el folpet, ambos con media de CE<sub>50</sub>> 40 mg de m. a./l. Finalmente se encontró el oxiclورو de cobre como el menos efectivo (media de CE<sub>50</sub>=78,03 mg de m. a./l), mostrando diferencias significativas con todos los otros fungicidas.

En el caso del hongo *N. luteum*, se distinguieron cuatro grupos de fungicidas significativamente diferentes entre ellos. En función de su efectividad, en el primer grupo se encontraron seis fungicidas: piraclostrobin (media de CE<sub>50</sub>=0,05 mg de m. a./l), tebuconazol (media de CE<sub>50</sub>=0,09 mg de m. a./l), ciproconazol (media de CE<sub>50</sub>=0,27 mg de m. a./l), boscalida (media de CE<sub>50</sub>=0,34 mg de m. a./l), metil tiofanato (media de CE<sub>50</sub>=8,33 mg de m. a./l) y tiram (media de CE<sub>50</sub>=13,81 mg de m. a./l). El segundo grupo lo constituyó el fungicida mancozeb (media de CE<sub>50</sub>=37,16 mg de m. a./l) y el tercer grupo

incluía a los fungicidas captan (media de  $CE_{50}=64,25$  mg de m. a./l) y folpet (media de  $CE_{50}=66,96$  mg de m. a./l). Finalmente, el oxiclورو de cobre (media de  $CE_{50}=92,72$  mg de m. a./l) fue el fungicida menos efectivo en la reducción del crecimiento miceliar.

Para el hongo *N. mediterraneum*, se distinguieron de nuevo cuatro grupos de fungicidas con diferencias significativas entre ellos. En el grupo más efectivo se encontraron los fungicidas tebuconazol (media de  $CE_{50}=0,21$  mg de m. a./l), metil tiofanato (media de  $CE_{50}=0,65$  mg de m. a./l), ciproconazol (media de  $CE_{50}=0,79$  mg de m. a./l) y piraclostrobin (media de  $CE_{50}=0,99$  mg de m. a./l). En el segundo grupo se encontraron los fungicidas captan (media de  $CE_{50}=45,66$  mg de m. a./l) y tiram (media de  $CE_{50}=56,65$  mg de m. a./l). El tercer grupo incluyó los fungicidas mancozeb (media de  $CE_{50}=80,97$  mg de m. a./l), folpet (media de  $CE_{50}=81,38$  mg de m. a./l) y oxiclورو de cobre (media de  $CE_{50}=82,38$  mg de m. a./l). En este caso, el fungicida boscalida fue el menos efectivo mostrando una  $CE_{50}>100$  mg de m. a./l.

En el caso del hongo *N. parvum*, los fungicidas más efectivos para la reducción del crecimiento miceliar fueron los fungicidas piraclostrobin, tebuconazol y metil tiofanato, que mostraron valores medios de  $CE_{50} < 1,0$  mg de m. a./l. Sin diferencias significativas con ellos, se encontraron los fungicidas captan (media de  $CE_{50}=3,83$  mg de m. a./l), ciproconazol (media de  $CE_{50}=4,32$  mg de m. a./l), y boscalida (media de  $CE_{50}=6,86$  mg de m. a./l). Los fungicidas tiram (media de  $CE_{50}=15,76$  mg de m. a./l), mancozeb (media de  $CE_{50}=22,88$  mg de m. a./l) y folpet (media de  $CE_{50}=40,91$  mg de m. a./l) se mostraron poco efectivos en la reducción del crecimiento miceliar y el oxiclورو de cobre (media de  $CE_{50}=65,38$  mg de m. a./l) fue el menos efectivo, mostrando diferencias significativas con todos los otros fungicidas.

#### VI.2.2. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS *IN PLANTA*

El análisis estadístico de los valores de longitud de la lesión mostró que no existían diferencias significativas entre hongos ni entre el tiempo de

inoculación (1-7 días). Tampoco se observaron diferencias significativas en las interacciones dobles o triples. Sin embargo, los fungicidas, sí mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 6.4.). Los valores medios de longitud de la lesión (cm), producidos por el conjunto de los hongos inoculados a los uno y siete días de la realización del corte de poda y tratamiento fungicida se muestran en la Figura 6.4.

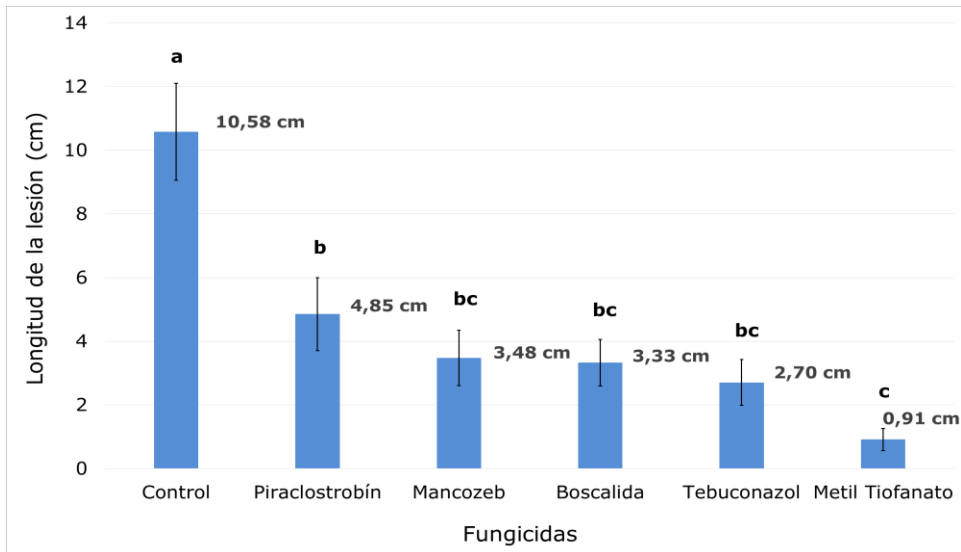
**Tabla 6.4.** Resultado del análisis de la varianza correspondiente al ensayo de fungicidas *in planta*, sobre la longitud de la lesión en heridas de poda tratadas con distintos fungicidas, e inoculadas a distintos tiempos con distintos hongos patógenos.

Fuente de Variación	Longitud de la lesión (cm)			
	gl <sup>a</sup>	CM <sup>b</sup>	F	P<F <sup>c</sup>
Experimento	1	67,183	1,66	0,1990
Tiempo	1	4,475	0,11	0,7398
Fungicida	5	531,689	13,14	<0,0001
Hongo	3	82,420	2,04	0,1098
Experimento x Hongo	3	40,955	1,01	0,3882
Experimento x Fungicida x Hongo	15	22,114	0,55	0,9116

a: grados de libertad.

b: Cuadrados medios.

c: Probabilidad asociada a test F individuales.



**Figura 6.4.** Valores de la longitud media (cm) de las lesiones producidas por el conjunto de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en almendros inoculados a los uno y siete días de la realización del corte de poda y tratamiento. Las letras distintas expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las medias.



En la Figura 6.4. se puede observar que, en cuanto a la longitud de la lesión, en los almendros del grupo control se produjeron las lesiones de mayor longitud (media=10,58 cm), con diferencias significativas respecto a los almendros tratados con fungicidas. Entre los almendros tratados, aquéllos tratados con metil tiofanato fueron los que mostraron las lesiones de menor longitud (media=0,91 cm), aunque no mostraron diferencias significativas con los tratados con mancozeb (media=3,48 cm), boscalida (media=3,33 cm) o tebuconazol (media=2,70 cm). Los almendros tratados con piraclostrobin (media=4,85 cm) fueron los que se mostraron las lesiones de mayor longitud, sin diferencias significativas con los tratados con mancozeb, boscalida o tebuconazol.

Para el porcentaje de reaslamiento, como se puede observar en la Tabla 6.5., al igual que en el caso anterior, sólo se detectaron diferencias significativas entre los fungicidas. En la Figura 6.5. se muestran los valores de porcentaje de reaslamiento de para cada fungicida.

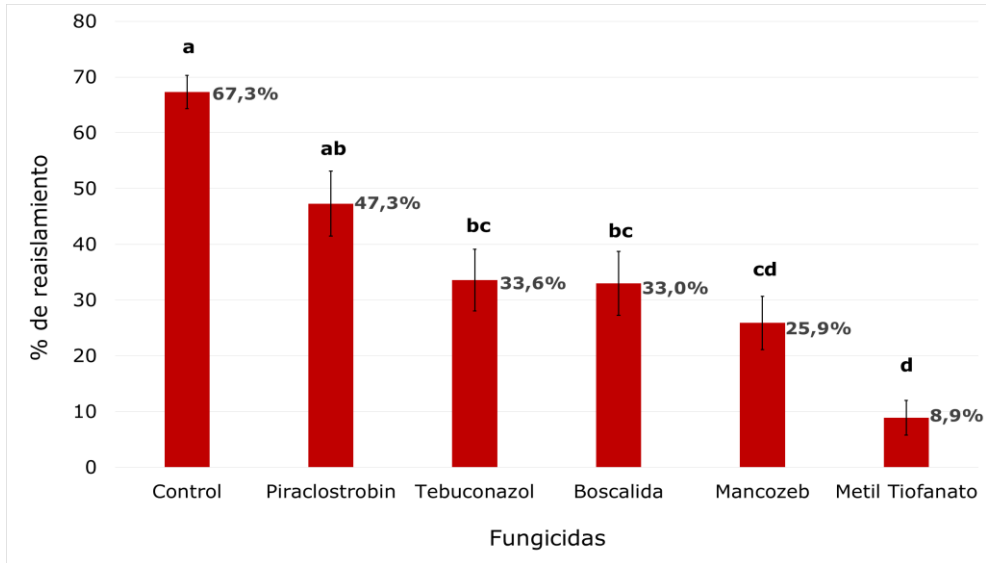
**Tabla 6.5.** Resultado del análisis de la varianza correspondiente al ensayo de fungicidas *in planta* sobre el porcentaje de reaslamiento a partir de heridas de poda tratadas con distintos fungicidas, e inoculadas a distintos tiempos con distintos hongos patógenos (el análisis estadístico de los datos se ha realizado con la transformación arcoseno ( $\arcsen(Y/100)^{1/2}$ )).

Fuente de Variación	% de aislamiento			
	gl <sup>a</sup>	MC <sup>b</sup>	F	P<F <sup>c</sup>
Experimento	1	0,25341	1,17	0,2810
Tiempo	1	0,78282	3,61	0,0589
Fungicida	5	1,83614	8,46	<0,0001
Hongo	3	0,18599	0,86	0,4641
Experimento x Hongo	3	0,08820	0,41	0,7484
Experimento x Fungicida x Hongo	15	0,12695	0,59	0,8845

a: grados de libertad.

b: Cuadrados medios.

c: Probabilidad asociada a test F individuales.



**Figura 6.5.** Valores medios del porcentaje de reaslamiento hongos de la familia Botryosphaeriaceae inoculados a los uno y siete días de la realización del corte de poda y tratamiento fungicida, presentados en función del fungicida aplicado. El análisis estadístico se ha realizado con la transformación a arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de aislamiento/100, por lo que las letras iguales expresan que no existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de dicha transformación.

Respecto al porcentaje de reaslamiento, se puede observar que en los almendros control se obtuvo el mayor porcentaje de reaslamientos positivos de hongos de la familia Botryosphaeriaceae (% de reaslamiento=67,3), mientras que en los almendros tratados con metil tiofanato (% de reaslamiento=8,9) se obtuvo el menor porcentaje de reaslamientos positivos (Figura 6.5.). En los almendros tratados con mancozeb se obtuvo un porcentaje de reaslamiento del 25,9 %, no mostrando diferencias significativas respecto al metil tiofanato, ni con las tratadas con tebuconazol (% de reaslamiento=33,6) o boscalida (% de reaslamiento=33). En los almendros tratados con piraclostrobin (% de reaslamiento=47,3) se obtuvo el mayor porcentaje de reaslamiento de entre los almendros tratados, no mostrando diferencias significativas con los controles, ni con los tratados con tebuconazol o boscalida.

### VI.3. DISCUSIÓN.

#### VI.3.1. ENSAYO *IN VITRO*

Los dos fungicidas más efectivos para la inhibición del crecimiento miceliar en todas las especies de Botryosphaeriaceae estudiadas, fueron el tebuconazol y el piraclostrobin.

Los resultados obtenidos *in vitro* con el tebuconazol coinciden con los resultados obtenidos en las evaluaciones de fungicidas realizados por Denman *et al.* (2004) para el control de *N. proteraeum* (Denman & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips en *Protea magnifica* Link en Sudáfrica, y con los de Bester *et al.* (2007) en Sudáfrica, Amponsah *et al.* (2012) en Nueva Zelanda y Pitt *et al.* (2012) en Australia, para el control especies de Botryosphaeriaceae en vid, ya que en todos ellos este fungicida también se mostró como uno de los más efectivos.

El fungicida piraclostrobin fue el otro fungicida más efectivo en nuestro estudio *in vitro*, coincidiendo con los resultados obtenidos por Pitt *et al.* (2012), en un ensayo de 17 materias activas *in vitro* para el control de cuatro especies fúngicas de la familia Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum* y *L. theobromae*) procedentes de vid. Estos autores encontraron que este fungicida era uno de los productos más eficaces en la reducción del crecimiento miceliar. En un trabajo posterior realizado por Twizeyimana *et al.* (2013), se estudió el efecto de 12 fungicidas distintos sobre la inhibición del crecimiento miceliar de varias especies de Botryosphaeriaceae procedentes de aguacate, entre ellas *N. luteum* y *N. parvum*, observando que el fungicida piraclostrobin también estuvo entre los que fueron más efectivos.

En nuestro trabajo, el metil tiofanato fue efectivo para la reducción del crecimiento miceliar ( $CE_{50} < 1$  mg/l) en todas las especies de Botryosphaeriaceae evaluadas, exceptuando para *N. luteum*, especie para la que el valor de  $CE_{50}$  fue algo superior al resto (media de  $CE_{50} = 8,33$  mg/l). En el estudio de Twizeyimana

*et al.* (2013) en aguacate, el metil tiofanato resultó poco efectivo para la inhibición del crecimiento micelial de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en comparación con los otros fungicidas estudiados y, por tanto, esta materia activa no fue utilizada en los estudios posteriores de protección de heridas de poda en árboles de aguacate en campo. No obstante, existen otros estudios en los que se evaluaron diversas materias activas fungicidas *in vitro* para reducción del crecimiento micelial de especies de Botryosphaeriaceae aisladas de albaricoquero y melocotonero (Li *et al.*, 1995), de alcornoque (Luque *et al.*, 2007) y de vid (Amponsah *et al.*, 2012), en los que también el metil tiofanato resultó ser uno de los fungicidas más efectivos.

El fungicida boscalida mostró en nuestro estudio valores medios de CE<sub>50</sub> muy diferentes según la especie evaluada. Fue uno de los fungicidas más efectivos frente a *N. luteum*, sin embargo, frente a *D. seriata* y *N. mediterraneum* este fungicida no se mostró efectivo en la reducción del crecimiento micelial, coincidiendo en este caso con los resultados de Bester *et al.* (2007) y Pitt *et al.* (2012) con especies de Botryosphaeriaceae aisladas de vid.

En nuestro estudio, el fungicida mancozeb se mostró poco efectivo en la inhibición del crecimiento micelial de especies de Botryosphaeriaceae de almendro. Este fungicida tampoco estuvo entre los más efectivos en los ensayos *in vitro* para el control de estos patógenos en vid, realizados por Denman *et al.* (2004) y Amponsah *et al.* (2012).

### VI.3.2. ENSAYO *IN PLANTA*

Como se ha visto en los resultados de nuestro ensayo, tanto para longitud de la lesión como para porcentaje de reaislamiento, no se observaron diferencias significativas entre especies fúngicas ni entre los dos tiempos (uno o siete días) transcurridos desde el tratamiento de las heridas hasta la inoculación de los hongos ensayados con respecto a la efectividad de los fungicidas. Esto coincide con los resultados obtenidos por Twizeyimana *et al.* (2013) en su

trabajo sobre el control de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en heridas de poda en aguacate, por lo que podemos considerar que el tratamiento fungicida se mantiene efectivo al menos hasta siete días después de la aplicación del mismo.

Entre los fungicidas seleccionados para este ensayo, el metil tiofanato fue el que presentó mejores resultados para la protección de heridas de poda contra los hongos ensayados en almendro, ya que con el empleo de este fungicida se obtuvieron las lesiones de menor longitud así como los porcentajes de reaslamiento más bajos. Esto coincide con los resultados obtenidos en los estudios de evaluación de tratamientos fungicidas para el control y protección de heridas de poda frente a hongos de la familia Botryosphaeriaceae en condiciones de campo según datos de Luque *et al.* (2007) para alcornoque en Cataluña, y de Rolshausen *et al.* (2010) y Amponsah *et al.* (2012), para vid en California y Nueva Zelanda, respectivamente.

El mancozeb, que, como se ha visto, resultó poco efectivo *in vitro*, mostró buenos resultados en cuanto al porcentaje de reaslamiento en el ensayo *in planta*. En los estudios en condiciones de campo de Denman *et al.* (2004) en *P. magnifica* y Amponsah *et al.* (2012) en vid, este fungicida también fue uno de los tratamientos más efectivos en el control de hongos de la familia Botryosphaeriaceae.

Con el fungicida boscalida, que se mostró muy variable y poco efectivo *in vitro*, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el mancozeb en los tratamientos de heridas de poda. En los estudios de Bester *et al.* (2007) y Pitt *et al.* (2012) este fungicida resultó ineficaz *in vitro* para el control de especies de Botryosphaeriaceae en vid y no se incluyó en el estudio en campo.

En nuestro estudio el tebuconazol, que se había mostrado muy efectivo *in vitro*, proporcionó en aplicación en heridas de poda mejores resultados en cuanto a longitud de lesión que en cuanto a porcentaje de reaslamiento. En los estudios en condiciones de campo realizados por Bester *et al.* (2007), Amponsah

*et al.* (2012) y Pitt *et al.* (2012) este fungicida fue uno de los fungicidas más eficaces para el control hongos de la familia Botryosphaeriaceae en vid. Sin embargo, en el estudio de Denman *et al.* (2004), a pesar de que había mostrado buenos resultados *in vitro*, no fue efectivo en condiciones de campo.

El fungicida piraclostrobin, que también presentó buenos resultados en cuanto a la reducción del crecimiento micelial *in vitro* en nuestro estudio, se mostró, sin embargo, como el fungicida menos efectivo para la protección de heridas de poda, coincidiendo con los resultados de Pitt *et al.* (2012), en vid, y Twizeyimana *et al.* (2013), en aguacate. No obstante, en el estudio de Rolshausen *et al.* (2010) piraclostrobin se mostró efectivo cuando fue aplicado en heridas de poda para el control de especies de Botryosphaeriaceae en vid.

Con todo lo comentado anteriormente, podemos considerar el metil tiofanato, que ha mostrado buenos resultados tanto en la reducción del crecimiento micelial de especies de Botryosphaeriaceae *in vitro* como en la protección de heridas de poda, como uno de los fungicidas potencialmente más interesante para el control de los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae en almendro.

## VII. Discusión general

---





## VII. DISCUSIÓN GENERAL

---

En esta Tesis se ha estudiado la etiología y el control de una problemática de decaimiento de ramas y muerte de almendros que se observa en Mallorca desde el año 2008.

En primer lugar, se realizaron prospecciones durante seis años consecutivos (de 2009 a 2014), visitando un total de 33 parcelas en diferentes zonas de cultivo, que permitieron caracterizar los síntomas asociados a esta problemática. Estos consistían en clorosis foliar, decaimiento generalizado y muerte de ramas, y se asociaban con síntomas internos en la madera, tales como necrosis sectoriales, punteaduras y anillos oscuros en la zona vascular o presencia de madera esponjosa. Estos síntomas coinciden con los que se han descrito en distintos países para enfermedades fúngicas de la madera, descritas en otros hospedantes distintos del almendro y causadas principalmente por hongos de las familias Botryosphaeriaceae, Diatrypaceae, Togniniaceae y Herpotrichiellaceae. Las enfermedades de la madera causadas por estos hongos han sido ampliamente estudiadas en otros cultivos, como la vid (Graniti *et al.*, 2000; Gramaje y Armengol, 2011; Úrbez-Torres, 2011; Berstch *et al.*, 2013; Gramaje *et al.*, 2015), los cítricos (Adesemoye y Eskalen, 2011a, 2011b; Eskalen *et al.*, 2011; Roccotelli *et al.*, 2014), el olivo (Moral *et al.*, 2010; Úrbez-Torres *et al.*, 2013) o el aguacate (McDonlad y Eskalen, 2011). También hay numerosos trabajos en los que se cita a hongos de estas familias asociados a decaimientos en *Prunus* spp. (Carter, 1982; Farr *et al.*, 1989; Pussey *et al.*, 1995; Mostert *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2008b; Trouillas *et al.*, 2010a; Quaglia *et al.*, 2013). Más concretamente, en el caso del almendro, Slippers *et al.* (2007) aislaron *N. australe* en Sudáfrica a partir de muestras de ejemplares de este cultivo con síntomas de decaimiento. Por otro lado, Inderbitzin *et al.* (2010) en California aislaron siete especies de hongos de

la familia Botryosphaeriaceae en almendros con síntomas de la enfermedad conocida allí como "Band Canker" que produce chancros en el tronco. Estas especies fueron *B. dothidea*, *D. seriata*, *Do. sarmentorum*, *N. australe*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum*.

En esta Tesis, se han identificado morfológica y molecularmente, mediante secuenciación de fragmentos de ADN (ITS,  $\beta$ -tubulina y factor de elongación 1- $\alpha$ , según el caso), un total de 16 especies de hongos asociados a las muestras analizadas. Éstas fueron 14 especies encontradas en muestras de almendros: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus*, *Pleurostomophora richardsiae* y dos especies encontradas sólo en muestras de una parcela de albaricoqueros situada junto a parcelas de almendros: *Pm. minimum* y *Pm. venezuelense*. Entre las especies identificadas en almendro, *C. hispanica* y *Pm. amygdalinum* corresponden a dos nuevas especies fúngicas que fueron descritas a partir de los trabajos realizados en esta Tesis.

Las especies de Botryosphaeriaceae constituyeron el grupo más abundante, identificándose 5 especies, siendo *D. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum* las especies más frecuentes. Además, *D. seriata* y *N. parvum* también se encontraron en algunas muestras de albaricoquero que fueron incluidas en el estudio por su cercanía a las parcelas de almendros. *Diplodia seriata*, que se encontró en 10 parcelas, fue una de las especies más frecuentemente aislada en este trabajo. Este resultado difiere del obtenido por Inderbitzin *et al.* (2010), ya que para estos autores esta especie fue minoritaria en las prospecciones de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en almendro en California. No obstante, *D. seriata* sí fue una de las especies predominantes en prospecciones realizadas en otros cultivos frutales en Sudáfrica (Damm *et al.*, 2007a; Slippers *et al.*, 2007; Cloete *et al.*, 2011). Por otra parte, *N. parvum*, aislado en nueve parcelas en nuestro estudio, sí fue de las especies aisladas mayoritariamente en almendro por Inderbitzin *et al.* (2010), además de ser también un patógeno

frecuente en otros muchos cultivos como la vid (Úrbez-Torres, 2011), el aguacate (Zea-Bonilla *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2009; Molina-Gayoso *et al.*, 2012), los cítricos (Adesemoye y Eskalen, 2011a), el melocotonero (Thomidis *et al.*, 2011) o el ciruelo (Moral *et al.* 2010), entre otros. En las prospecciones se encontró *N. luteum* también en nueve de las parcelas prospectadas. Sin embargo, Slippers *et al.* (2007) no aislaron este hongo en su estudio sobre hongos de la familia Botryosphaeriaceae en frutales de hueso y pepita en Sudáfrica y otras zonas del mundo. *Neofusicoccum luteum* es una especie aislada frecuentemente en vid con síntomas de chancros y decaimiento (Van Niekerk *et al.*, 2004; Luque *et al.* 2009; Úrbez-Torres y Gubler 2009; Chebil *et al.*, 2014) y también se ha encontrado afectando a otros cultivos como olivo (Sergeeva *et al.*, 2009; Úrbez-Torres *et al.*, 2013) o aguacate (McDonald *et al.*, 2009) en California. En España, *N. luteum* también se ha descrito afectando a rododendros (Pintos *et al.*, 2011b) y en caquis, asociado a pudriciones postcosecha del fruto (Palou *et al.*, 2013). En cinco parcelas se encontró *N. mediterraneum*, que también es una de las especies que Inderbitzin *et al.* (2010) detectaron con más frecuencia en almendro. Nuevamente, se trata de una especie muy citada en vid, asociada a enfermedades de la madera (Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2011; Pintos *et al.*, 2011a), aunque también se ha encontrado en olivos y pistachos con ramas secas (Moral *et al.*, 2010) o asociada a enfermedades de nogales (Trouillas *et al.*, 2010b) y caquis (Palou *et al.*, 2013), entre otros cultivos. Finalmente, *D. olivarum* se encontró en siete parcelas. Hasta ahora este hongo, descrito recientemente (Lazziera *et al.*, 2008a), se había asociado únicamente a olivo (Lazziera *et al.*, 2008a), algarrobo (Granata *et al.*, 2011) y vid (Linaldeddu *et al.*, 2015).

La especie *P. richardsiae*, perteneciente a la familia Herpotrichiellaceae, también se aisló con elevada frecuencia, concretamente en diez parcelas. Se trata de un patógeno emergente que se ha asociado con enfermedades de la madera de la vid en California (Rolshausen *et al.* 2010) y en el sur de Italia (Carlucci *et al.*, 2015), y que en ensayos de patogenicidad en vid realizados por Halleen *et al.* (2007) en Sudáfrica, tanto en invernadero como en campo, causó síntomas similares a los de la enfermedad de Petri. Además, esta especie se

consideró el patógeno más agresivo en olivo entre varios otros hongos aislados de este cultivo que mostraban síntomas de decaimiento en Italia (Carlucci *et al.*, 2013).

También fue muy frecuente la presencia de *C. hispanica*, que se aisló en nueve parcelas. El género *Collophora* fue propuesto por Damm *et al.* (2010) englobando especies que se aislaban con frecuencia a partir de madera necrótica de *Prunus* spp. en Sudáfrica, incluido el almendro.

En las prospecciones se aislaron dos especies del género *Phaeocremonium* en almendro: *Pm. amygdalinum*, y *Pm. iranianum*, que supone la primera cita de especies de *Phaeocremonium* afectando a este cultivo. Estas especies sólo se encontraron en muestras procedentes de dos parcelas pero dado los numerosos trabajos que citan a especies del género *Phaeocremonium* asociadas a enfermedades fúngicas de la madera en otros cultivos, especialmente en vid (Larignon y Dubos, 1997; Scheck *et al.*, 1998; Aroca *et al.*, 2010; Gramaje y Armengol, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2014; Gramaje *et al.*, 2015) y también en plantas del género *Prunus* (Mostert *et al.*, 2003, 2006; Damm *et al.*, 2008b), su papel en decaimiento de ramas de almendro podría ser relevante.

También se encontraron dos especies de Diatrypaceae, *E. lata* y *E. leptoplaca*. La primera es un patógeno importante de cultivos tales como albaricoque o la vid, encontrándose ampliamente distribuida en todo el mundo (Carter 1957), y que ya se había asociado con chancros en almendros en Australia (Carter, 1982) y Grecia (Rumbos, 1985). Por otro lado, *E. leptoplaca* ha sido citada como patógeno de vid en California (Trouillas y Gubler, 2004), mientras que Trouillas *et al.* (2011) encontraron este hongo en especies de los géneros *Fraxinus*, *Ficus*, *Populus* y *Quercus*. Este trabajo supone la primera vez que se cita la presencia de *E. leptoplaca* en almendro.

Finalmente, en este estudio también se aislaron hongos basidiomicetos en muestras de nueve de las parcelas, concretamente, se aislaron tres especies:

*Phellinus pomaceus* en siete parcelas, *Fomitiporia mediterranea* en dos parcelas y *Omphalotus olearius* en una parcela. La identificación de hongos basidiomicetos como agentes causales de síntomas de pudrición seca o madera esponjosa es frecuente en cultivos como la vid. Larignon y Dubos (1987), comprobaron la implicación de *Phellinus* sp. en las enfermedades de la madera, aunque como invasor secundario. Así mismo, *F. mediterranea*, también se ha asociado con enfermedades de madera de la vid (Fischer, 2002). Recientemente, Cloete *et al.* (2015) remarcaron la importancia y diversidad de especies de basidiomicetos asociadas a pudriciones de madera del tipo yesca en vid en Sudáfrica. Por otro lado, también se ha encontrado *F. mediterranea* como principal hongo asociado a pudriciones de madera de cítricos en el sur de Italia, encontrándose también *Phellinus* spp., aunque con menor frecuencia (Roccotelli *et al.*, 2014).

La distribución de las diferentes especies fúngicas aisladas en nuestro estudio fue variable en las distintas comarcas prospectadas, aunque, en general, las especies que se aislaron con más frecuencia, es decir en mayor número de parcelas, fueron a su vez las que se hallaron más distribuidas, presentes en más comarcas.

Una vez determinadas las especies fúngicas asociadas a enfermedades de la madera en almendro en Mallorca, se estudió la patogenicidad a este cultivo de algunas de las especies aisladas más frecuentemente en las prospecciones.

En primer lugar, se estudiaron las cinco especies de Botryosphaeriaceae y las dos de Diatrypaceae encontradas, realizando inoculaciones en árboles de 1-2 años de cuatro variedades diferentes de almendro ('Jordi', 'Ferragnes', 'Pons' y 'Vivot'), durante dos años consecutivos (2013 y 2014), plantados en una parcela experimental en Mallorca. En ambos años, las inoculaciones se realizaron en primavera y se evaluaron el invierno siguiente. Aunque Inderbitzin *et al.* (2010) evaluaron la patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae en almendro a los 54 días de la inoculación, en nuestro caso, al contar también con especies del género *Eutypa*, decidimos esperar 9 meses basándonos en el

estudio de patogenicidad de Pitt *et al.* (2013) con especies de Diatrypaceae en vid.

Durante la realización del ensayo se observó que los árboles inoculados con especies del género *Neofusicoccum* y con *D. seriata* desarrollaron chancros con emisión de goma, mientras que los que habían sido inoculados con *Diplodia olivarum*, las especies de Diatrypaceae y los almendros control apenas mostraron síntomas externos. Internamente, los árboles inoculados mostraron lesiones necróticas de longitud variable según el hongo inoculado.

El año 2013 *N. luteum* fue el hongo que causó las lesiones internas de mayor longitud en las cuatro variedades de almendro. Los siguientes hongos que causaron mayores longitudes de lesión fueron *N. parvum* y *N. mediterraneum*. En un grupo siguiente, de acuerdo a la longitud de la lesión generada, se incluían *D. seriata* y *E. lata*, mientras que en todas las variedades, *D. olivarum* y *E. leptoplaca* fueron los hongos que causaron las lesiones de menor tamaño. Martos (2008) ya había demostrado la patogenicidad en almendro de los hongos *D. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum*, siendo el primero el más virulento, aunque sin mostrar diferencias significativas con los otros. Por otro lado, en el trabajo de Inderbitzin *et al.* (2010), *D. seriata*, *N. mediterraneum* y *N. parvum* también resultaron patógenos en almendro, pero en este caso la especie más virulenta fue *N. parvum*. Además, los resultados de este año coinciden con los obtenidos en vid por Úrbez-Torres y Gubler (2009) en California, por Billones *et al.* (2014) en Nueva Zelanda y por Luque *et al.* (2009) en Cataluña, en los que *N. luteum* y *N. parvum* fueron las especies más virulentas en los ensayos de patogenicidad.

El año 2014 se observó que las lesiones de mayor longitud fueron causadas por *N. parvum* y *N. mediterraneum*, y no por *N. luteum* como ocurrió el primer año. Las especies que causaron lesiones de menor tamaño fueron *D. olivarum* y *E. leptoplaca*. La patogenicidad de *N. mediterraneum* había sido demostrada en vid en España (Martín *et al.*, 2011; Pintos *et al.*, 2011a) y en California (Úrbez-Torres *et al.*, 2010), y en olivo en California (Moral *et al.*, 2010).

Respecto a la patogenicidad de hongos de la familia Diatrypaceae, *E. lata* produjo lesiones significativamente distintas a las de los árboles control en las cuatro variedades de almendro estudiadas, y en los dos años del ensayo, confirmándose su patogenicidad a almendro como ya habían comprobado Carter (1982) y Rumbos (1985). En cuanto a *E. leptoplaca*, Trouillas y Gubler (2010) habían demostrado la patogenicidad de este hongo en vid en California y, posteriormente, en un estudio de patogenicidad en vid con ocho especies de Diatrypaceae realizado por Pitt *et al.* (2013), *E. leptoplaca* fue una de las especies que originó las lesiones mayores. No obstante, en nuestro estudio este hongo fue el que produjo las lesiones de menor longitud en ambos años y en todas las variedades, excepto en 'Ferragnes'. Además *E. leptoplaca* no mostró diferencias significativas respecto al control en la variedad 'Pons' el primer año de ensayo.

*Diplodia olivarum* es una especie descrita recientemente, aislada en Italia en olivo (Lazziera *et al.*, 2008a), algarrobo (Granata *et al.*, 2013) y vid (Linedaddu *et al.*, 2015), y que en nuestros ensayos de patogenicidad mostró resultados dispares en los dos años de ensayo.

En cuanto a la sensibilidad de las distintas variedades de almendro, se observó que en todas variedades los hongos inoculados se mostraron como patógenos, exceptuando los casos ya comentados de *E. leptoplaca* en la variedad 'Pons' en el año 2013, y de *D. olivarum* en la variedad 'Vivot' en 2013, y en las variedades 'Ferragnes' y 'Jordi' en 2014. Se ha podido observar que, en general, la variedad 'Jordi' fue la menos sensible el primer año, y que 'Vivot' y 'Ferragnes' lo fueron el segundo año.

Paralelamente al ensayo de patogenicidad con especies de Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae, en esta Tesis se ha estudiado la patogenicidad a almendro de once aislados de las especies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* y *P. richardsiae*, encontrados también en las prospecciones. En este caso el ensayo se realizó en invernadero sobre plántones de almendro en macetas, todos de la variedad 'Ferragnes'. La evaluación se

realizó a los seis meses de la inoculación, midiendo la longitud de las lesiones necróticas internas que se hubieran generado.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre aislados dentro de la misma especie y las cuatro especies ensayadas causaron necrosis internas en la madera de los almendros significativamente de mayor longitud que las observadas en las plantas control, confirmándose que estos hongos deben ser considerados como patógenos de la madera en almendros.

La mayoría de las citas de hongos del género *Phaeoacremonium* asociados a enfermedades de la madera hacen referencia al cultivo de la vid y la mayoría de los ensayos de patogenicidad con especies de este género se han realizado con la especie *Pm. minimum*, ya que ésta es la más común en vid. No obstante, también se han citado especies de *Phaeoacremonium* en otros hospedantes. En concreto, de las 46 especies descritas hasta ahora, hay 25 especies que se han asociado con síntomas de enfermedades en hospedantes distintos a la vid (Gramaje *et al.*, 2015), incluidos especies del género *Prunus*, aunque no en almendro. Suponiendo por tanto esta Tesis la primera vez que *Phaeoacremonium* spp. se han aislado de almendro y confirmado su patogenicidad en este cultivo, incluyendo la nueva especie *Pm. amygdalinum*.

Respecto a *C. hispanica*, hasta la fecha no se habían realizado ensayos de patogenicidad con esta especie. No obstante, Damm *et al.* (2010) inocularon otras cinco especies de *Collophora* en albaricoque, melocotonero y ciruelo, confirmándose la patogenicidad sólo en algunas combinaciones hongo-planta; estas fueron *C. africana* y *C. rubra* en albaricoquero, *C. parla* en ciruelo, *C. pallida* en melocotonero y albaricoquero.

*Pleurostomophora richardsiae* hasta ahora sólo se había descrito como patógeno en vid en California (Rolshausen *et al.*, 2010), en Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2007) y en olivo en Italia, donde como en nuestro caso, resultó ser el hongo más agresivo de los estudiados (Carlucci *et al.*, 2013).



*C. hispanica*, *P. richardsiae*, *Pm. amygdalinum* y *Pm. iranianum* son especies de crecimiento lento, que probablemente han sido a menudo excluidas de los resultados de las prospecciones de hongos en las plantas leñosas, de manera similar a lo que ocurre con *Cadophora luteo-olivacea*. Esta especie fue citada por primera vez en material de plantación de vid aparentemente sano en Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2003) y, desde entonces, ha sido encontrada afectando a vides en todo el mundo (Gramaje *et al.*, 2014b). Por ello, se debe considerar el papel de estas especies como patógenos asociados con enfermedades de la madera en muestras de plantas leñosas con síntomas de decaimiento.

En el último Capítulo de la Tesis se realizó un estudio de evaluación de fungicidas para la protección de heridas de poda frente a la infección por cuatro especies de Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*), el grupo más frecuente en los resultados de las prospecciones. El estudio se realizó en dos fases, una evaluación *in vitro* (reducción del crecimiento micelar) con 10 fungicidas. Posteriormente, cinco de estos fungicidas (boscalida, mancozeb, metil tiofanato, piraclostrobin y tebuconazol) se evaluaron sobre plantones de almendro aplicándolos en heridas de poda. Además, para comprobar la duración en el tiempo de la protección otorgada por los fungicidas, la inoculación de los hongos se realizó en dos momentos: 1) transcurrido un día después de la realización del corte y aplicación de los fungicidas y 2) transcurridos siete días. La evaluación se realizó midiendo y comparando la longitud de la lesión producida, así como el porcentaje de reaslamiento del patógeno inoculado en cada caso.

Los resultados obtenidos *in vitro* mostraron que los fungicidas más efectivos fueron el tebuconazol y el piraclostrobin, coincidiendo con resultados obtenidos por Bester *et al.* (2007) en Sudáfrica, Amponsah *et al.* (2012) en Nueva Zelanda y Pitt *et al.* (2012) en Australia para el control de especies de Botryosphaeriaceae en vid. Sin embargo, el piraclostrobin no estuvo entre los más efectivos en un ensayo de Twizeyimana *et al.* (2013), de inhibición del

crecimiento micelial de varias especies de Botryosphaeriaceae aisladas de aguacate.

En nuestro trabajo, el metil tiofanato fue efectivo para la reducción del crecimiento micelial en todas las especies de Botryosphaeriaceae evaluadas, exceptuando para *N. luteum*. Existen otros estudios en los que se evaluaron diversas materias activas fungicidas *in vitro* para reducción del crecimiento micelial de especies de Botryosphaeriaceae aisladas de albaricoquero y melocotonero (Li *et al.*, 1995), de alcornoque (Luque *et al.*, 2007) y de vid (Amponsah *et al.*, 2012), en los que también el metil tiofanato resultó ser uno de los fungicidas más efectivos.

Por otro lado, los resultados del estudio de protección de heridas de poda mostraron que tanto para longitud de la lesión como para el porcentaje de reaslamiento, no se observaron diferencias significativas entre especies fúngicas ni entre los dos tiempos de inoculación (uno o siete días) tras el tratamiento. Esto coincide con lo obtenido por Twizeyimana *et al.* (2013) en su trabajo sobre el control de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en heridas de poda en aguacate. Por tanto, podemos considerar que el tratamiento fungicida se mantiene efectivo durante al menos hasta siete días después de la aplicación.

En nuestro estudio el tebuconazol, que se había mostrado muy efectivo *in vitro*, proporcionó en aplicación en heridas de poda mejores resultados en cuanto a longitud de lesión que en cuanto a porcentaje de reaslamiento. Algo similar ocurrió en el estudio de Denman *et al.* (2004) para el control de *N. protearum* en *P. magnifica*, en el que a pesar de que este fungicida había mostrado buenos resultados *in vitro*, no fue efectivo en condiciones de campo.

El fungicida piraclostrobin, que presentó buenos resultados en cuanto a la reducción del crecimiento micelial en nuestro estudio, se mostró, sin embargo, como el fungicida menos efectivo para la protección de heridas de poda, coincidiendo con los resultados de Pitt *et al.* (2012) en vid y Twizeyimana *et al.* (2013) en aguacate.

El fungicida metil tiofanato fue el que presentó los mejores resultados para la protección de heridas de poda contra especies de Botryosphaeriaceae en almendro, coincidiendo con los resultados de los estudios de protección de heridas de poda de Luque *et al.* (2007) para alcornoque, y de Rolshausen *et al.* (2010) y Amponsah *et al.* (2012) para vid. Por tanto, podría ser considerado como una materia activa potencialmente recomendable para el control de dichos hongos en almendro.



## VIII. Conclusiones

---



## VIII. CONCLUSIONES

---

1. En prospecciones realizadas durante seis años (2009-2014), se han caracterizado los síntomas asociados al decaimiento de ramas y muerte de almendros observados en la isla de Mallorca desde el año 2008. Estos síntomas han consistido en clorosis foliar, decaimiento generalizado y muerte de ramas, que se correspondían con síntomas internos en la madera tales como necrosis sectoriales, punteaduras y anillos oscuros en la zona vascular, o presencia de madera esponjosa.
2. A partir de muestras de madera afectada se han identificado morfológicamente y mediante técnicas moleculares 14 especies fúngicas asociadas a estos síntomas en almendro: *Collophora hispanica*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Omphalotus olearius*, *Phaeoacremonium amygdalinum*, *Pm. iranianum*, *Phellinus pomaceus* y *Pleurostomophora richardsiae*.
3. La presencia en almendro de las especies *Pm. amygdalinum* y *Pm. iranianum* supone la primera cita de hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium* en este cultivo. Además, *C. hispanica* y *Pm. amygdalinum* son dos nuevas especies que han sido descritas a partir de aislados obtenidos en las prospecciones realizadas.
4. Las especies aisladas con más frecuencia han sido *P. richardsiae*, *C. hispanica* y las cinco especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae: *N. parvum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *D. olivarum* y *D. seriata*.
5. La distribución de las especies fue variable en las distintas comarcas prospectadas, aunque, en general las especies que se aislaron con más frecuencia, es decir, en mayor número de parcelas, fueron a su vez las que se hallaron más distribuidas, en más comarcas. La comarca en la que

se encontró una mayor diversidad de especies fúngicas fue la de Llevant donde se aislaron la totalidad de las 14 especies encontradas.

6. Se ha demostrado la patogenicidad a almendro de las cinco especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (*N. parvum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *D. olivarum* y *D. seriata*) y las dos especies de Diatrypaceae (*E. lata* y *E. leptoplaca*) en ensayos realizados durante dos años con árboles pertenecientes a las variedades 'Ferragnes', 'Jordi', 'Vivot' y 'Pons'. Las especies que causaron las lesiones de mayor longitud media en almendro fueron *N. luteum* el primer año de ensayo, y *N. parvum* y *N. mediterraneum* el segundo año. Mientras que en ambos años la especie que causó lesiones de menor longitud media fue *E. leptoplaca*.
7. En estos ensayos de patogenicidad se observó un efecto del hongo inoculado dependiendo de la variedad de almendro evaluada. En general la variedad 'Jordi' fue la menos susceptible el primer año de estudio, y 'Vivot' y 'Ferragnes' lo fueron el segundo año.
8. Se ha demostrado la patogenicidad a almendro de las especies *C. hispanica*, *Pm. amygdalinum*, *Pm. iranianum* y *P. richardsiae* en ensayos realizados con plantones de la variedad 'Ferragnes' en invernadero. *P. richardsiae* fue la especie que causó la mayor longitud media de lesión.
9. Los fungicidas tebuconazol y piraclostrobin, seguidos del ciproconazol y el metil tiofanato, se mostraron como los más efectivos en la evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en almendro.
10. El fungicida metil tiofanato, fue el fungicida más efectivo para la protección de heridas de poda en almendros frente a la infección por hongos de la familia de Botryosphaeriaceae.



## IX. Bibliografía

---



## IX. BIBLIOGRAFÍA

---

- ABREO, E., MARTÍNEZ, S., BETTUCCI, L., LUPO, S. 2011. *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S77–S85.
- ADESEMOYE, A. O., ESKALEN, A. 2011a. First report of *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum australe*, and *N. parvum* causing branch Canker of *Citrus* in California. *Plant Disease* 95:770.
- ADESEMOYE, A. O., ESKALEN, A. 2011b. First report of *Eutypella* spp. associated with Branch Canker of *Citrus* in California. *Plant Disease* 95:1187.
- AGARWAL, D. K., CHOWDHRY, P. N., SARBHOY, A. K. 1992. Contributions to our knowledge of *Aplosporella*. *Mycotaxon* 45: 389–403.
- AGUSTÍ, M. 2004. *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 496 pp.
- 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.
- AMPONSAH, N. T., JONES, E. E., RIDGWAY, H. J., JASPERS, M. V. 2009. First report of *Neofusicoccum australe* (*Botryosphaeria australis*), a cause of grapevine dieback in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 6–8.
- AMPONSAH, N. T., JONES, E. E., RIDGWAY, H. J., JASPERS, M. V. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science* 68: 676–683.
- ANÓNIMO, 2009. Butlletí de Sanitat Vegetal, Agost. Conselleria d’Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI57101&id=57101>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]

- ANÓNIMO, 2010a. Butlletí de Sanitat Vegetal, Març. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI67929&id=67929>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]
- ANÓNIMO, 2010b. Butlletí de Sanitat Vegetal, Juny. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI76527&id=76527>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]
- ANÓNIMO, 2010c. Butlletí de Sanitat Vegetal, Octubre. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI76527&id=76527>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]
- ANÓNIMO, 2011. Butlletí de Sanitat Vegetal, Juny. Conselleria de Presidència. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI101156&id=101156>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]
- ANÓNIMO, 2012. Butlletí de Sanitat Vegetal, Agost. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori. Palma de Mallorca, España. [En línea]  
<<http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST94ZI10494&id=10494>> [Consulta: 15 de mayo de 2014]
- ANÓNIMO, 2014. Anuario de Estadística Agraria 2014 (Avance). Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España. [En línea] <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2014/default.aspx>> [Consulta 21 de septiembre de 2015]
- ANÓNIMO, 2014b. Análisis del Comercio Exterior. Informe Anual 2014 Ed. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. NIPO: 280-14-045-3.
- ARMENGOL, J., VICENT, A., TORNÉ, L., GARCÍA-FIGUERES, F. Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2001. Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera de vid en diversas zonas españolas. Boletín de Sanidad Vegetal 27: 137-153.

- ARMENGOL, J., GRAMAJE, D., PÉREZ-SIERRA, A., LANDERAS, E., ALZUGARAY, R., MARTOS, S., LUQUE, J. 2008. First report of canker disease caused by *Neofusicoccum australe* on Eucalyptus and Pistachio in Spain. *Plant Disease* 92: 980.
- AROCA, A., GARCIA-FIGUERES, F., BRACAMONTE, L., LUQUE, J., RAPOSO, R. 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115: 195–202.
- AROCA, A., GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., RAPOSO, R. 2010. Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126: 165–174.
- ARX J. A. VON, MÜLLER, E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11(1): 1–434.
- ARZANLOU, M., NARMANI, A., KHODAEI, S., MOSHARI, S. 2014. Pome and stone fruit trees as possible reservoir hosts for *Phaeoacremonium* spp., the causal agents of grapevine esca disease, in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47: 717–727.
- BALLESTER, A. 1916. Enfermedades del almendro en Baleares. Ed. Consejo Provincial de Fomento de Baleares. 56 pp.
- BARRADAS, C., CORREIA, A., ALVES, A. 2013. First Report of *Neofusicoccum australe* and *N. luteum* Associated with Canker and Dieback of *Quercus robur* in Portugal. *Plant Disease* 97: 560.
- BASKARATHEVAN, J., JASPERS, M. V., JONES, E. E., RIDGWAY, H. J. 2013. Development of isolate-specific markers for *Neofusicoccum parvum* and *N. luteum* and their use to study rain water splash dispersal in the vineyard. *Plant Pathology* 62: 501–509.
- BERRAF-TEBBAL A., BOUZNAD Z., SANTOS J. M., COELHO M. A., PÉROS J. P., PHILLIPS A. J. L. 2011. *Phaeoacremonium* species associated with *Eutypa* Dieback and Esca of grapevines in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S86–S97.

- BERSTCH, C., RAMÍREZ-SUERO, M., MAGNIN-ROBERT, M, LAURIGNON, P., CHONG, J., ABOU-MANSOUR, E., SPAGNOLO, A., CLÉMENT, C., FONTAINE, F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62: 243–265.
- BESOAIN, X., TORRES, C., DÍAZ, G. A., LATORRE, B. A. 2013. First report of *Neofusicoccum austral* associated with Botryosphaeria Canker of grapevine in Chile. *Plant Disease* 97: 143.
- BESTER, W., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against Botryosphaeria species. *Australasian Plant Pathology* 36: 73–77.
- BILLONES-BAAJEINS, R., JONES, E. E., RIDGWAY, H. J., JASPERS M. V., 2014. Susceptibility of common rootstock and scion grapevine varieties in New Zealand to Botryosphaeriaceae species. *Australasian Plant Pathology* 43: 25–31.
- BURGESS, T. I., BARBER, P. A., HARDY, G. E. ST J. 2005. *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia, including the description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. *Australasian Plant Pathology* 34: 557–567.
- CARLUCCI, A., CIBELLI, F., LOPS, PHILLIPS, A. J. L., F., CICCARONE, C., RAIMONDO M. L. 2015. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 109–123.
- CARLUCCI, A., RAIMONDO M. L., CIBELLI, F., PHILLIPS, A. J. L., LOPS, F. 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 517–527.
- CARTER, M. V. 1957. *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany* 5: 21–35.
- CARTER, M. V. 1982. Additional hosts of *Eutypa armeniaca* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 11: 46–48.

- CASTILLO, S., BORRERO, C., CASTAÑO, R., RODRIGUEZ, A., AVILES, M. 2013. Fungal first report of Canker Disease caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. australe* on Blueberry bushes in Spain. *Plant Disease* 97: 1112.
- CHEBIL, S., FERSI, R., YAKOUB, A., CHENENAOU, S., CHATTAOUI, M., MELKI, I., ZEMNI, H., RHOUMA, A., DURANTE, G., ZACCHI, E., MLIKI, A. 2014. First report of *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, and *Neofusicoccum luteum* associated with canker and dieback of grapevines in Tunisia. *Plant Disease* 98: 420.
- CHEN, S. F., MORGAN, D. P., HASEY, J. K., ANDERSON, K., MICHAILIDES, T.J. 2014a. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant Disease* 98: 636–652.
- CHEN, S. F., MORGAN, D. P., MICHAILIDES, T.J. 2014b. Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae associated with panicle and shoot blight of pistachio in California, USA. *Fungal Diversity* 67: 157–179.
- CHIARAPPA, L. 2000. Esca (black measles) an over review. *Phytopathologia Mediterranea* 39:11–15.
- CHOI, IN-YOUNG; SHARMA, PRAVEEN KUMAR; CHEONG, SEONG-SOO. 2012. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with bark dieback of blueberry in Korea. *Plant Pathology Journal* 28: 217.
- CHOUDHURY, K., CLARK, J., GRIFFITHS, H. R. 2014. An almond-enriched diet increases plasma  $\alpha$ -tocopherol and improves vascular function but does not affect oxidative stress markers or lipid levels. *Free Radical research* 48: 599–606.
- CLOETE, M., FISCHER, M., MOSTERT, L., HALLEEN, F. 2015. Hymenochaetales associated with esca-related wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2: 299–312.
- CLOETE, M., FOURIE, P. H, DAMM, U., CROUS, P. W., MOSTERT, L. 2011. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees with a

special reference to grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S176–S190.

CONSELLERIA D'AGRICULTURA I PESCA 2009. Informe de diagnóstico sobre el sector de la almendra de Mallorca. Ed. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca, España. 35 pp.

CORTESI, P., FISCHER, M., MILGROOM, M. G. 2000. Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. *Phytopathology* 90: 967–972.

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

CROUS, P. W., GAMS, W., WINGFIELD, M. J., VAN WYK, S. 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88: 786–796.

CROUS, P. W., VERKLEY G. J. M., GROENEWALD, J. Z., SAMSON, R. A. (EDS). 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. 269 pp.

DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. 2007a. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: 664–680.

DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. 2008a. A bitunicate ascus mechanism in the Calosphaeriaceae, with novel species of *Jattaea* and *Calosphaeria* on *Prunus* wood. *Persoonia* 20: 39–52.

DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. 2009. Stone fruit trees – an inoculum source of grapevine trunk disease pathogens? *Phytopathologia Mediterranea* 48: 175–176.

DAMM, U., FOURIE, P. H., CROUS, P. W. 2007b. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic Botryosphaeriaceae. *Fungal Diversity* 27: 35–43.



- DAMM, U., FOURIE, P. H., CROUS, P. W. 2010. *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia* 24: 60–80.
- DAMM, U., MOSTERT, L., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. 2008b. Novel *Phaeocremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia* 20: 87–102.
- DAMM, U., VERKLEY, G. J. M., CROUS, P. W., FOURIE, P. H., HAEGI, A., RICCIONI, L. 2008c. *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts, including *P. variable* and *P. africanum* spp. nov. *Persoonia* 20: 9–17.
- DE CAL, A., MELGAREJO E. 2000. Momificado de los frutales de hueso (*Monilia* sp) En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 66-67. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- DENMAN, S., CROUS, P. W., SADIE, A., WINGFIELD, M. J. 2004. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape province of South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33: 97–102.
- DÍAZ, G. A., LATORRE, B. A. 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection* 46:106–112.
- DIOGO, E. L. F., SANTOS, J. M., PHILLIPS, A. J. L. 2010. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity* 44: 107–115.
- DUPONT, J., LALOU, W., MANGIN, S., LARIGNON, P., ROQUEBERT, M. F., 2000. *Phaeocremonium viticola*, a new species associated with esca disease of grapevine in France. *Mycologia* 92 (3): 499–504.
- EL-GOORANI, M. A. EL MELEIGI, M. A. 1972. Dieback of grapevine by *Botryodiplodia theobromae* Pat. in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* 11: 210–211.

- ELLIS, M. B., ELLIS, J. P. 1997. Microfungi on land plants: An identification handbook. The Richmond Publishing Co., Ltd. 868 pp.
- ENGLISH, H., DAVIS, J. R. 1965. Apricot dieback fungus found on western chokecherry. Plant Disease Reports 49: 178.
- ENGLISH H, DAVIS J. R., DEVAY J. E. 1966. *Dothiorella* canker, a new disease of almond trees in California. Phytopathology 56: 146.
- ESKALEN, A., ADESEMOYE, A., WANG, D. 2011. Identification of different species causing Botryosphaeriaceae canker in citrus reveal *Neofusicoccum mangiferae* with Scytalidium-like synanomorph. Phytopathology 101: S49.
- ESSAKHI, S., MUGNAI, L., CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z., & SURICO, G. 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine. Persoonia 21: 119–134.
- ESTRUCH, R., ROS, E., SALAS-SALVADÓ, J., COVAS, M. I., CORELLA, D., ARÓS, F., GÓMEZ-GRACIA, E., RUÍZ-GUTIÉRREZ, V., FIOL, M., LAPETRA, J., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., SERRA-MAJEM, L., PINTÓ, X., BASORA, J., MUÑOZ, M. A., SORLÍ, J. V., MARTÍNEZ, J. A., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. New England Journal of Medicine, 368: 1279–1290.
- FAOSTAT. División de estadística de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). [En línea] <<http://faostat.fao.org>> [Consulta: agosto de 2015].
- FARR, D. F., BILLS, G. F., CHAMURIS, G. P., ROSSMAN, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. St Paul, American Phytopathological Society. 1252 pp.
- FARR D. F., ROSSMAN A. Y., PALM M. E., MCCRAY E. B. 2015. Fungal databases, systematic botany & mycology laboratory, ARS, USDA. [En línea] <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>> [Consulta: 15 septiembre de 2015].

- FELIPE, J. A. 2000. El almendro: I El material vegetal. Ed. Mira, Zaragoza, España. 464 pp.
- FERREIRA, J. H. S., WYK, P.S., AND VENTER, E., 1994. Slow dieback of grapevine: association of *Phialophora parasitica* with slow dieback of grapevines. South African Journal of Enology and Viticulture 15: 9–11.
- FISCHER, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycetes species associated with Esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycological progress 1: 315–324.
- FISCHER, M. 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. Phytopathologia Mediterranea 45: S30–42.
- GARCÍA BENAVIDES, P., MARTÍN ZAMORANO, P., OCETE PÉREZ, C.A., MAISTRELLO, L., OCETE RUBIO, R. 2013. Biodiversity of pathogenic wood fungi isolated from *Xylotrechus arvicola* (Olivier) galleries in wine shoots. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 47(2): 73.
- GARCÍA, F., TORRES, E., MARTOS, S., CALVET, C., CAMPRUBÍ, A., ESTAÚN V., LUQUE, J. 2005. Enfermedades de la madera de la vid en Cataluña. Viticultura/Enología profesional, 99: 19–28.
- GARDES, M., BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113–118.
- GLASS, N. L., 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.
- GLAWE, D. A. Y ROGERS, J. D. 1984. Diatrypaceae in the Pacific Northwest. Mycotaxon 20: 401–460.
- GRAMAJE, D., AGUSTÍ-BRISACH, C., PÉREZ-SIERRA, A., MORALEJO, E., OLMO, D., MOSTERT, L., DAMM, U., ARMENGOL, J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). Persoonia 28: 1–13.

- GRAMAJE, D., ALANIZ, S., PÉREZ-SIERRA, A., ABAD-CAMPOS, P., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J. 2007. First report of *Phaeoacremonium mertoniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91: 1206
- GRAMAJE, D., ALANIZ, S., PÉREZ-SIERRA, A., ABAD-CAMPOS, P., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J. 2008. First report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 92: 836.
- GRAMAJE, D., ARMENGOL, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040–1055
- GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., COLINO, M. I., SANTIAGO, R., MORALEJO, E., OLMO, D., LUQUE, J., MOSTERT, L. 2009a. First report of *Phaeoacremonium inflatipes*, *P. iranianum*, and *P. sicilianum* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 93: 964–965.
- GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., MOHAMMADI, H., BANIHASHEMI, Z., MOSTERT, L. 2009b. Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia* 101: 920–929.
- GRAMAJE, D., AROCA, A., RAPOSO, R., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., 2009c. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 28: 1091–1097
- GRAMAJE, D., LEÓN, M., PÉREZ-SIERRA, A., BURGESS, T., ARMENGOL, J. 2014a. New *Phaeoacremonium* species isolated from sandalwood trees in western Australia. *IMA Fungus* 5: 67–77.
- GRAMAJE, D., LEÓN, M., SANTANA, M., CROUS, P. W., ARMENGOL, J. 2014b. Multilocus ISSR markers reveal two major genetic groups in Spanish and South African populations of the grapevine fungal pathogen *Cadophora luteo-olivacea*. *PLoS ONE*, 9(10), e110417.
- GRAMAJE, D., MOSTERT, L., GROENEWALD, J. Z., CROUS, P. W. 2015. *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology* 119: 759–783.

- GRANATA, G., FAEDDA, R., SIDOTI, A. 2011. First report of canker disease caused by *Diplodia olivarum* on carob tree in Italy. *Plant Disease* 95: 776.
- GRANITI, A., SURICO, G., MUGNAI, L. 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 16–20.
- GRASSELLY C., CROSSA-RAYNAUD, P. 1984. El almendro. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 465 pp.
- GROVE, W. B. 1935. British stem- and leaf-fungi: coelomycetes vol.1. Sphaeropsidales with hyaline conidia. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. 488 pp.
- GURE, A., SLIPPERS, B., STENLID, A. 2005. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Mycological Research* 109: 1005–1014.
- HALLEEN, F., CROUS, P. W., PETRINI, O. 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32: 47–52.
- HALLEEN, F., FOURIE, P. H., LOMBARD P. J. 2010. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 31: 125–132.
- HALLEEN, F., MOSTERT, L., CROUS, P. W. 2007. Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36: 277–285.
- HAUSNER, G., EYJÓLFSDÓTTIR, G.G., REID, J., KLASSEN, G.R. 1992. Two additional species of the genus *Togninia*. *Canadian Journal of Botany* 70: 724–734.
- HAWKSWORTH, D. L., GIBSON, I. A. S., GAMS W. 1976. *Phialophora parasitica* associated with disease conditions in various trees. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 427–431.

- INDERBITZIN, P., BOSTOCK, R. M., TROUILLAS, F. P., MICHAILIDES, T. J. 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia* 102: 1350–1368.
- JACOBS, K., BERGDAHL, D. R., WINGFIELD, M. J., HALK, S., SEIFERT, K. A., BRIGHT, D. E., WINGFIELD, B. D. 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research* 108: 411–418.
- JIAO, Z. J., KAN, Y. C., HUANG, S. L. 2014. First report of Dieback Disease on cedars caused by *Diplodia seriata* in China. *Plant Disease* 98: 1279–1280.
- KALITERNA, J., MILICEVIC, T., IVIC, D., BENCIC, D., MESIC, A. 2012. First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive Dieback in Croatia. *Plant Disease* 96: 290.
- KESTER, D. E., GRADZIEL, T. M., GRASSELLY, C. 1990. Almonds (*Prunus*) en Moore, J. N., Ballington, J. R. (Ed.), Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Horticulturae* 290: 701–758.
- KOIKE, S. T., ROONEY-LATHAM, S., WRIGHT, A. F. 2014. First report of Stem Blight of blueberry in California caused by *Neofusicoccum parvum*. *Plant Disease* 98: 1280.
- LARIGNON, P., DUBOS B., 1987. Les sequences parasitaires impliquées dans le syndrome de l'esca. Symposium sur la lutte intégrée en viticulture. Logrono, Portugal, 3–5 marzo 1987.
- LARIGNON, P., DUBOS B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147–157.
- LAUNDON, G. F. 1973. *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spireae* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society* 61: 369–374.
- LAZZIZERA, C., FRISULLO, S., ALVES, A., LOPES, J., PHILLIPS, A. J. L. 2008a. Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum* sp. nov. *Fungal Diversity* 31: 63–71.

- LAZZIZERA, C., FRISULLO, S., ALVES, A., PHILLIPS, A. J. L. 2008b. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drup rot in olives in southern Italy. *Plant Pathology* 57: 948–956.
- LI, H. Y., CAO, R. B., MU, Y. T. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of jappanese apricot and peach trees in Zhejiang province, China. *Crop Protection* 14: 187–191.
- LINALDEDDU, B. T., DEIDDA, A., SCANU, B., FRANCESCHINI, A., SERRA, S., BERRAF-TEBBAL, A., BOUTITI, M.Z., BEN JAMAA, M. L., PHILLIPS, A. J. L. 2015. Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp nov. *Fungal Diversity* 71: 201–214.
- LUQUE, J., PERA, J., PARLADÉ, J. 2007. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 38: 147–155.
- LÓPEZ, M. M., CUBERO, J., LLOP, P., PEÑALVER, R., VICEDO, B. 2000. Tumores bacterianos de los frutales de hueso y pepita (*Agrobacterium* spp.) En “Montesinos, E. *et al.* (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso”: 45-47. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- LUQUE, J., GARCÍA-FIGUERES, F., LEGORBURU, F. J., MURUAMENDIARAZ, A., ARMENGOL, J., TROUILLAS, F. P. 2012. Species of *Diatrypaceae* associated with grapevine trunk diseases in eastern Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 528–540.
- LUQUE, J., MARTOS, S., AROCA, A., RAPOSO, R., GARCÍA-FIGUERES, F., 2009. Symptoms and fungi associated with declinin mature grapevine in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91: 381–390.
- MARTÍN, M. T., COBOS, R. 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46: 18–25.

- MARTÍN, M. T., MARTÍN, L., CUESTA, M. J. 2011. First report of *Neofusicoccum mediterraneum* and *N. australe* causing decay in *Vitis vinifera* in Castilla y Leon, Spain. *Plant Disease* 95: 876.
- MARTOS, S. 2008. El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Tesis Doctoral, Universidad Autònoma de Barcelona.
- MATEO-SAGASTA, E. 2000a. Chancro común causado por *Nectria* spp. en frutales de pepita. En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 71. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- MATEO-SAGASTA, E. 2000b. Chancro y secas causados por *Valsa* sp. En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 73. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- MATEO-SAGASTA, E. 2000c. *Eutypa lata* en frutales de hueso. En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 74. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- McALPINE, D. 1902. Fungus diseases of stone-fruit trees in Australia and their treatment. Agriculture Department of Victoria, Melbourne, Australia. 165 pp.
- MCDONALD, V., ESKALEN, A. 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease* 95:1465–1473.
- MCDONALD, V., LYNCH, S., ESKALEN, A. 2009. First report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, and *N. parvum* associated with avocado branch canker in California. *Plant Disease* 93: 967.
- MEHL, J. W. M., SLIPPERS, B., ROUX, J., WINGFIELD, M. J. 2011. Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia* 103: 534–553.



- MELGAREJO, P. 2000. Mal del plomo (*Chondrostereum purpureum*). En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 74-75. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- MELGAREJO, P., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., JORDÁ, M. C., LÓPEZ, M. M., ANDRES M. F. (Coordinadores), 2010. Patógenos de plantas descritos en España. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España. 855 pp.
- MISHRA, S. 2015. India Tree Nuts Annual. USDA. GAIN Report: IN5116 [En línea] <[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Tree%20Nuts%20Annual\\_New%20Delhi\\_India\\_9-15-2015.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Tree%20Nuts%20Annual_New%20Delhi_India_9-15-2015.pdf)> [Consulta 20 de noviembre de 2015]
- MOHAMMADI, H., BANIHASHEMI, Z. 2012. First report of *Phaeoacremonium inflatipes* and *Phaeoacremonium mortoniae* associated with grapevine Petri Disease in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 14: 1405-1414.
- MOLINA-GAYOSO, E., SILVA-ROJAS, H. V., GARCÍA-MORALES, S., AVILA-QUEZADA, G. 2012. First report of black spots on avocado fruits caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. Plant Disease 96: 287.
- MONDELLO, V., LO PICCOLO, S., CONIGLIARI, G., ALFONZO, A., TORTA, L., BURRUANO, S. 2013. First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with Botryosphaeria dieback of grapevine in Sicily (Italy). Phytopathologia Mediterranea 52: 388-396.
- MONTESINOS, E., MELGAREJO, P., CAMBRA, M. A., PINOCHET, J. (editores) 2000. Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Coed. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- MORAL, J., LUQUE, F., TRAPERO, A 2007. First report of *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusa*, causing fruit rot of olive in Spain. Plant Disease 92: 311.
- MORAL, J., MÚÑOZ-DIEZ, C., GONZÁLEZ, N., TRAPERO, A., MICHAILIDES, T. J. 2010. Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species

collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100: 1340–1351.

MORGAN, D. P., MICHAILIDES, T. J. 2012. *Neofusicoccum mediterraneum* causing cankers and *Diplodia mutila* and *Diplodia seriata* isolated from pomegranate (*Punica granatum*) in California. *Phytopathology* 102 (S4): 83.

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: 1–115.

MOSTERT, L., GROENEWALD, J. Z., SUMMERBELL, R. C., ROBERT V., SUTTON D. A., PADHYE A. A., CROUS P. W. 2005. Species of *Phaeoacremonium* associated with human infections and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1752–1767

MOYO, P., ALLSOPP, E., ROETS, F., MOSTERT, L., HALLEEN, F. 2014. Arthropods vector grapevine trunk diseases pathogens. *Phytopathology* 104: 1063–1069.

MUNKVOLD, G. P., MAROIS, J. J. 1994. *Eutypa* dieback of sweet cherry and occurrence of *Eutypa lata* perithecia in the central valley of California. *Plant Disease* 78: 200–207.

NIRENBERG, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169: 1–117.

O'DONNELL, K., CIGELNIK, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116.

- OGAWA, J. M., ZHER, E. I., BIRD, G. W., RITCHIE, D. F., URIU, K., UYEMOTO, J. K. 2000. Enfermedades de los frutales de hueso. Ed. American Phytopathological Society y Mundi-Prensa. Madrid, España. 97 pp.
- OZBEN, S., Degirmenci, K., Demirci, F., UZUNOK, S. 2012. First report of *Phaeoacremonium scolyti* associated with Esca and Petri Diseases of Grapevine in Turkey. *Plant Disease* 96: 766.
- PALAZÓN, J. 1968. Variedades de almendras, en Diez temas sobre frutos secos. Publicaciones de Capacitación Agraria. Ministerio de Agricultura Madrid, España. pp. 103-125.
- PALAZÓN, J. 1970. El almendro en Baleares. Instituto nacional de Investigaciones Agronómicas. 154 pp.
- PALOU, J., MONTESINOS-HERREO, C., BESADA, C. 2013. Postharvest fruit rot of Persimmon (*Diospyros kaki*) in Spain caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum* spp. *Journal of Phytopathology* 161: 625-631.
- PENNYCOOK, S. R. Y SAMUELS G. J., 1985. Botryosphaeria and Fusicoccum species associated with ripe fruit rot of Actinidia deliciosa (Kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24: 445-58.
- PHILLIPS, A. J. L. 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146: 327-332.
- PHILLIPS, A. J. L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 318.
- PHILLIPS, A. J. L. 2006. The Botryosphaeria site. [En línea] <[http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria\\_site](http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site)> [Consulta: 15 de septiembre 2015].
- PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76(1): 51-167.

- PINTOS, C., REDONDO, V., AGUÍN, O., MANSILLA, J. P. 2011a. First report of cankers and dieback caused by *Neofusicoccum mediterraneum* and *Diplodia corticola* on grapevine in Spain. *Plant Disease* 95: 1315.
- PINTOS, C., REDONDO, V., MANSILLA, J. P., AGUÍN, O. 2011b. First report of dieback on hybrid Rhododendrons caused by *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum* in Spain. *Plant Disease* 95: 221.
- PITT, W. M., SOSNOWSKI, M. R., HUANG, R., QIU, Y., STEEL, C. C., SAVOCCHIA, S. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease* 96: 1303–1308.
- PITT, W. M., TROUILLAS, F. P., GUBLER, W. D., SAVOCCHIA, S., SOSNOWSKI, M. R. 2013. Pathogenicity of Diatrypaceous fungi on grapevines in Australia. *Plant Disease* 97: 749–756.
- PONS, A., SIMONET, B., 1970. Planificación del cultivo del almendro. Dirección General de Agricultura, Jefatura Agronómica de Baleares. Imp. Jorvich. Palma de Mallorca, España. 52 pp.
- POPUSHOI, I. S. 1971. Microflora plodovykh derevyaev SSSR (Mycoflora of fruit trees in the USSR). Moscow.
- PUNITHALINGAM E, WALLER J. M. 1973. *Botryosphaeria obtusa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 394. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- PUSEY, P. L., KITAJIMA, H., WU, Y. 1995. Fungal gummosis. In: Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Uyemoto, J.K. (eds), *Compendium of stone fruit diseases*. St. Paul, APS Press. 128 pp.
- QUAGLIA M., MORETTI, M., BUONAURO, R. 2013. Molecular characterization of *Diplodia seriata*, a new pathogen of *Prunus laurocerasus* in Italy. *Phytoparasitica* 42: 189–197.
- RALLO, J., SACARÉS, J. 1997. La història de l'ametler a Mallorca Mitjançant la bibliografia. Ed. De pinte en Ample. Lluçmajor, España. 52 pp.

- RIERA, F. J., FERRÁN J. 1970. Cultivo del almendro. Ed Aedos. 170 pp.
- ROCCOTELLI, A., SCHENA, L., SANZANI, S. M., CACCIOLA, S. O., MOSCA, S., FAEDDA, R., IPPOLITO, A., MAGNANO DI SAN LIO, G. 2014. Characterization of basidiomycetes associated with wood rot of citrus in southern Italy. *Phytopathology* 104: 851–858.
- ROLSHAUSEN, P. E., ÚRBEZ-TORRES, J. R., ROONEY-LATHAM, S., ESKALEN, A., SMITH, R. J., & GUBLER W. D. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 113–119.
- ROMERO-RIVAS, L. C., ÁLVAREZ, L. A., GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., CARDENAS-GIRALDO, C. 2009. First report of *Phaeoacremonium parasiticum* causing Petri disease of Grapevine in Peru. *Plant Disease* 93: 200.
- RUBÍ, V. 1980. El Almendro. Ed. Delegación del Ministerio de Agricultura en Baleares. Dilagro, Lérida, España. 267 pp.
- RUMBOS I. C. 1985. Further pathogenicity studies of *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*) on almond. *Options Mediterraneennes* 1: 79–89.
- RUMBOS, I. C. 1986. *Phialophora parasitica*, causal agent of cherry dieback. *Journal of Phytopathology* 117: 283–287.
- SCHECK, H. J., VASQUEZ, S. J., GUBLER, W. D., FLOGE, D. 1998. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease* 98: 590.
- SERGEVA, B., ALVES, A., PHILLIPS, A. J. L. 2009. *Neofusicoccum luteum* associated with leaf necrosis and fruit rot of olives in New South Wales, Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 294–299.
- SERRA, S., MANNONI, M. A., LIGIOS, V. 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 234–246.

- SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83–101.
- SLIPPERS, B., SMIT, W. A., CROUS, P. W., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South African and other regions of the world. *Plant Pathology* 56: 128–139
- SMIT, W., VILJOEN, C., WINGFIELD, B., WINGFIELD, M., CALITZ, F. 1996. A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease* 80: 1331–1335.
- SOSNOWSKI, M. R., LOSCHIAVO, A. P., WICKS, T. J., SCOTT, E. S. 2013. Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease* 97: 1599–1604
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CABI-publishing, Wallingford, Reino Unido. 696 pp.
- TAYLOR, A., HARDY, G. E. ST. J., WOOD, P., BURGESS, T. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34: 187–195.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- THOMIDIS, T., MICHAILIDES, T. J., EXADAKTYLOU, E. 2011. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131: 661–668.
- TROUILLAS, F. P., GUBLER, W. D. 2004. Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen of grapevine in Northern California. *Mycological Research* 108: 1195–1204.

- TROUILLAS, F. P., GUBLER, W. D. 2010. Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology* 100: 1048–1056.
- TROUILLAS, F. P., PITT, W. M., SOSNOWSKI, M. R., HUANG, R., PEDUTO, F., LOSCHIAVO, A., SAVOCCHIA, S., SCOTT, E. S., GUBLER, W. D. 2011. Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity* 49: 203–223.
- TROUILLAS, F. P., ÚRBEZ-TORRES, J. R., GUBLER, W. D. 2010a. Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker disease in California. *Mycologia* 102: 319–336.
- TROUILLAS, F. P., ÚRBEZ-TORRES, J. R., PEDUTO, F., GUBLER, W. D. 2010b. First report of twig and branch dieback of english walnut (*Juglans regia*) caused by *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Disease* 94: 1267.
- TUSET, J. J. 2000. Chancros en ramas causados por *Phomopsis* spp. En "Montesinos, E. et al. (Edit.): Enfermedades de los frutales de pepita y hueso": 72-73. Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, Madrid, España. 148 pp.
- TUSET, J. J., PORTILLA, M. T. 1989. Taxonomic status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdalina*. *Canadian Journal of Botany* 67: 1275–1280.
- TWIZEYIMANA, M., McDONALD, V., MAYORQUIN, J. S., WANG, D. H., NA, F., AKGÜL, D. S., ESKALEN, A. 2013. Effect of fungicide application on the management of avocado branch canker (formerly *Dothiorella* canker) in California. *Plant Disease*. 97: 897–902.
- UECKER, F. A. 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology, and biology. *Mycologia Memoir* No. 13. Cramer, Berlin. 231 pp.
- ÚRBEZ-TORRES J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S5–S45.

- ÚRBEZ-TORRES J. R., GUBLER W. D. 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93: 584–592.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R., GUBLER, W. D. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* 60: 261–270.
- ÚRBEZ-TORRES J. R., HAGG, P., BOWEN, P., O'GORMAN, D. T. 2014. Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with Esca and Petri Diseases of grapevine. *Plant Disease* 98: 468–482.
- ÚRBEZ-TORRES J. R., LEAVITT G. M., VOEGEL T. M., GUBLER W. D. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490–1503.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R., PEDUTO, F., GUBLER, W. D. 2010. First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassispora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Disease* 94: 785.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R., PEDUTO, F., VOSSEN, P. M., VOEGEL, T. M., GUBLER, W. D. 2013. Olive Twig and Branch Dieback: etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease* 97: 231–244.
- VAN NIEKERK, J. M., CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z. E., FOURIE, P. H., HALLEEN, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781–98.
- VIJAYKRISHNA, D., MOSTERT, L., JEEWON, R., GAMS, W., HYDE, K. D., & CROUS, P. W. 2004. *Pleurostomophora*, an anamorph of *Pleurostoma* (Calosphaeriales) a new anamorph genus morphologically similar to *Phialophora*. *Studies in Mycology* 50: 387–395.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, J. W. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis MA, Gelfand DHSnisky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California. 482 pp.



- WHITE, C. L., HALLEEN, F., FISCHER, M., & MOSTERT, L. 2011. Characterisation of the fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S204–S223.
- WRIGHT, E. R.; MANDOLESI, A.; RIVERA, M. C.; PÉREZ, B. A. 2011. *Neofusicoccum parvum*, blueberry pathogen in Argentina. XXVIII International horticultural congress on science and horticulture for people (IHC2010): International Symposium on Berries: From genomics to sustainable production quality and health. *Acta Horticulturae* 926: 619–623.
- WOLLENWEBER, H. W. 1941. *Diplodia sarmentorum* Fries und ihre Verbreitung. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 2*, 103: 347–357.
- WOLLENWEBER, H. W., HOCHAPFEL H. 1941. Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze 1. *Diplodia* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 12: 167–250.
- ZEA-BONILLA, T., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M. A, MARTÍN-SÁNCHEZ, P. M., PÉREZ-JIMÉNEZ, M. 2007. Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalucía region, Spain. *Plant Disease* 91: 1052.
- ZHENGZHOU, Y., GALE, F. 2015. China's Potential as an Export Market for Tree Nuts Fruit and Tree Nuts Outlook Special Article. Economic Research Service, USDA. FTS-358SA. [En línea]  
<<http://www.ers.usda.gov/media/1811357/fts358sa.pdf>> [Consulta 20 de noviembre de 2015]