

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE  
VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Potencial de los tratamientos por termoterapia  
con agua caliente para el control de hongos de la  
madera de la vid y su efecto sobre la micoflora  
total, después de un año de cultivo.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Máster en Ingeniería Agronómica

ALUMNO: Aitor Gavara Vidal

TUTOR: Josep Armengol Fortí

*Curso académico: 2015/2016*

**VALENCIA, Septiembre de 2016**

**Título:** Potencial de los tratamientos por termoterapia con agua caliente para el control de hongos de la madera de la vid y su efecto sobre la micoflora total, después de un año de cultivo.

**Resumen:**

Las enfermedades fúngicas que afectan a la madera de la vid son consideradas unas de las patologías más dañinas de este cultivo. Su efecto se ha visto incrementado de manera alarmante en los últimos tiempos, sobre todo en vides jóvenes. Las plantas infectadas muestran alteraciones internas en la madera, necrosis y pudriciones que provocan un menor desarrollo de las plantas y un decaimiento generalizado, que puede terminar con su muerte.

Numerosas investigaciones han demostrado la efectividad de la termoterapia con agua caliente utilizada en el proceso viverístico contra este tipo de enfermedades. En un Trabajo Final de Master presentado en el año 2015 se demostró que inmediatamente después del tratamiento por termoterapia en las plantas de vid injertadas la micoflora total y su diversidad disminuyen, así como el número de infecciones por parte de los hongos patógenos de la madera de la vid.

Los objetivos de este trabajo son comparar el efecto de la aplicación de tratamientos de termoterapia con agua caliente a 50 °C 30 min. y 53 °C 30 min. y sin tratamiento, para observar si hay diferencias en la micoflora presente en plantas injertadas tras un ciclo de cultivo, respecto a la micoflora que había en las mismas plantas justo después del tratamiento (un año antes). Para ello, se realizaron aislamientos fúngicos en plantas sometidas a un tratamiento de termoterapia con agua caliente a 50 °C 30 min., a 53 °C 30 min. y plantas sin tratar después de un ciclo de cultivo, para identificar la micoflora total, obteniendo número de plantas infectadas y porcentaje de infección por cada género o especie detectada.

Los resultados muestran que tras un ciclo de cultivo la micoflora total en las plantas sometidas a los tres tratamientos se iguala, probablemente por reinfecciones producidas en el campo. En el caso de los hongos patógenos de la madera de la vid, los resultados varían entre géneros y especies pero, globalmente, se puede afirmar que su presencia después de un ciclo de cultivo disminuye con el tratamiento por termoterapia.

**Palabras clave:** Enfermedades fúngicas de la madera, Termoterapia con agua caliente, Vid, Vivero

**Alumno:** Aitor Gavara Vidal

**Tutor académico:** Josep Armengol Fortí

Valencia, 09 de Septiembre de 2016

**Title:** *Potential of hot-water treatments to control grapevine fungal trunk pathogens and their effect on the total mycoflora after one growing season.*

**Abstract:**

Grapevine fungal trunk diseases are considered one of the most severe limiting factors of this crop. There has been an alarming increase in the incidence of these diseases in the last few years, especially in young vines. Infected plants show internal alterations in the trunk, necrosis and rotting that result, among others, in a poor plant development and a generalized decline, leading to death.

Several investigations have shown the efficacy of hot-water treatments in the grapevine nurseries against these diseases. In a Master's Thesis handed in 2015 it was shown that immediately after the hot-water treatment the total mycoflora and its diversity decrease in grapevine grafted plants as well as the number of infections caused by fungal trunk pathogens.

The objectives of this work are to compare the effects of the application of the hot-water treatments at 50°C 30 min and 53°C 30 min. and without treatment to determine if there are some differences in mycoflora after one growing cycle, compared with the mycoflora that was present in the same plants immediately after the hot-water treatment (one year before). For this, fungal isolations were performed and the fungal colonies were identified, in order to determine the number of plants infected and the percentage of infection for each fungus detected.

The results revealed that after a growing season the total mycoflora in the three treatments is balanced, due probably to reinfections produced in the field. In the case of the grapevine fungal trunk pathogens, the results vary among the species or genus but, in general, it can be affirmed that after one growing season the incidence of grapevine fungal trunk pathogens decrease with the hot-water treatments.

**Keywords:** Fungal trunk pathogens, Grapevine, Hot water treatment, Nursery

**Student:** Aitor Gavara Vidal

**Supervisor:** Josep Armengol Fortí

Valencia, 9<sup>th</sup> September 2016

A Josep Armengol por toda la ayuda recibida durante el trabajo.

A Maela y a Toni por la ayuda prestada en momentos concretos de la fase experimental.

A toda mi familia.

A todos mis amigos.

# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Situación actual de la viticultura.....	1
1.2. Los viveros de viñedo: el proceso viverístico.....	4
1.3. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid.....	6
1.4. Control de las enfermedades producidas por los hongos de la madera en la vid. .....	10
1.4.1. La termoterapia con agua caliente. ....	10
1.4.2. Efecto de los tratamientos por termoterapia con agua caliente sobre la microflora presente en plantas de vid injertadas.....	12
<b>2. Justificación y objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>14</b>
3.1. Material vegetal .....	14
3.2. Aislamiento fúngico.....	15
3.3. Identificación de las colonias.....	16
3.3.1. Identificación morfológica.....	16
3.3.2. Identificación molecular .....	16
<b>4. Resultados.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>28</b>
5.1. Microflora en las plantas después de un ciclo de cultivo.....	28

5.2. Diferencias entre las especies presentes en la micoflora de plantas de vid injertadas analizadas inmediatamente tras el tratamiento y plantas que han permanecido una campaña de cultivo.....	31
5.3. Eficacia de los tratamientos tras un año de cultivo.....	33
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>36</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Cebadores utilizados para la identificación molecular junto a su secuencia, su temperatura de anilleamiento y la región amplificada.....	17
Tabla 2. Número de plantas infectadas y porcentaje de puntos de aislamiento que pertenecen a géneros y especies fúngicas para los tres tratamientos descritos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) para la zona del injerto y para la zona del patrón. En total se realizaron 300 puntos de aislamiento por cada tratamiento y zona (15 puntos de aislamiento por 20 plantas)....	20
Tabla 3. Número de plantas infectadas y porcentaje de puntos de aislamiento que pertenecen los hongos de la madera de la vid para los tres tratamientos descritos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) para la zona del injerto y para la zona del patrón. En total se realizaron 300 puntos de aislamiento por cada tratamiento y zona (15 puntos de aislamiento por 20 plantas)..	25

## Índice de figuras

Figura 1. Países que encabezan la producción mundial de vid en el año 2013 .....	2
Figura 2. Principales países productores de vino en el año 2015 .....	2
Figura 3. Principales exportaciones de España .....	3
Figura 4. Diagrama que muestra de manera resumida el proceso viverístico general. (Abreviaciones: fa, otoño; wi, invierno; sp, primavera; su, verano). Las estaciones corresponden al hemisferio norte. ....	6
Figura 5. A, Coloración y necrosis internervial producidos por yesca. B, Descomposición de la madera producida por <i>Fomitiporia mediterranea</i> . C, Sintomatología característica de eutipiosis, retraso y desarrollo anormal de las brotaciones. D, Necrosis sectorial en los brazos causada por eutipiosis y por decaimiento por <i>Botryosphaeria</i> . E, Necrosis sectorial y xilemática, características de la	

enfermedad de Petri. F, Necrosis y muerte de raíces en la base del patrón de una planta joven característica del pie negro (Fuente: MAGRAMA, 2014). .....	9
Figura 6. A, Zona del injerto (izquierda) y su corte longitudinal (derecha). B, Zona basal de la planta (izquierda) y su corte longitudinal (derecha). .....	15
Figura 7. Colonias repicadas preparadas para la identificación. ....	16
Figura 8. Porcentaje de puntos de aislamiento, con o sin crecimiento fúngico, en la zona del injerto y de la base del patrón para los tres tratamientos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) en plantas de vid injertadas tras un ciclo de cultivo. En cada tratamiento se extrajeron 300 puntos de aislamiento para las zonas de injerto y otros 300 para la zona del patrón (20 plantas por tratamiento y 15 puntos de aislamiento por planta y zona de análisis). ....	18
Figura 9. Zona del injerto. Número de plantas en las que se aislaron los diferentes hongos de la madera de la vid identificados (Bd: <i>Botryosphaeria dothidea</i> ; Cl: <i>Cadophora luteo-olivacea</i> ; Da: <i>Dactylonectria alcacerensis</i> ; Dt: <i>Dactylonectria torresensis</i> ; Ds: <i>Diplodia seriata</i> ; Np: <i>Neofusicoccum parvum</i> , Pm: <i>Phaeoacremonium mínimum</i> y Pc: <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ) y su porcentaje de aislamiento respecto a todos los puntos en los distintos tratamientos (Control, 50°C 30 minutos y 53°C 30 minutos). Se han evaluado para cada tratamiento un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas y 15 puntos de aislamiento por planta). ....	26
Figura 10. Zona de la base del patrón. Número de plantas en las que se aislaron los diferentes hongos de la madera de la vid identificados (Bd: <i>Botryosphaeria dothidea</i> ; Cl: <i>Cadophora luteo-olivacea</i> ; Da: <i>Dactylonectria alcacerensis</i> ; Dt: <i>Dactylonectria torresensis</i> ; Ds: <i>Diplodia seriata</i> ; Np: <i>Neofusicoccum parvum</i> , Pm: <i>Phaeoacremonium mínimum</i> y Pc: <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ) y su porcentaje de aislamiento respecto a todos los puntos en los distintos tratamientos (Control, 50°C 30 minutos y 53°C 30 minutos). Se han evaluado para cada tratamiento un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas y 15 puntos de aislamiento por planta). ....	27



# 1. Introducción

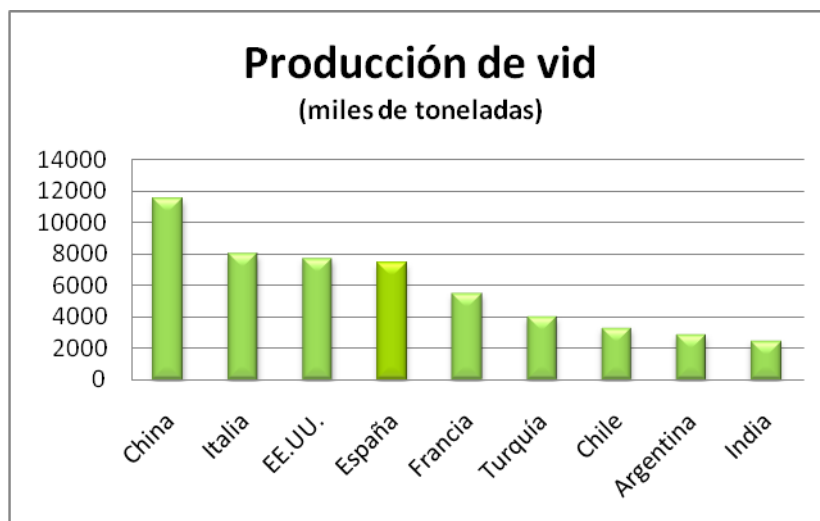
## 1.1. Situación actual de la viticultura

La vid es uno de los cultivos más antiguos del mundo y en las últimas décadas la evolución del mismo ha aumentado notablemente, debido a nuevas técnicas más modernas que facilitan el trabajo del agricultor y que permiten una respuesta a las exigencias del mercado entre las que se encuentra la aplicación de las recientes normativas europeas de producción integrada (Reyner, 2002).

Las diferentes variedades del viñedo suelen agruparse según su finalidad: uva de mesa (en referencia a la producción que se consume en fresco) y uva de transformación (para aquella producción cuyo destino es la elaboración de vino, mosto y pasificación) (MAGRAMA, 2014a).

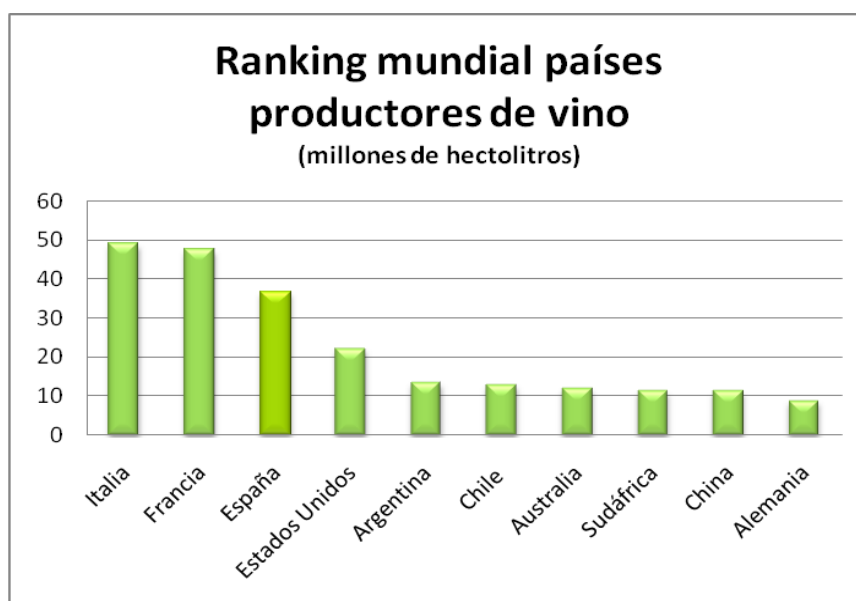
España, según datos de La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), es el país con mayor superficie dedicada a la producción de vid con aproximadamente 1 millón de hectáreas, seguida de China con 799.000, Francia con 792.000, Italia con 690.000 y Turquía con 502.000. Además, estos 5 países acaparan el 50% de la superficie mundial de viñedo. De la superficie de producción en España, un 98,3% se corresponde con los viñedos de uva para vinificación, seguida de muy lejos por un 1,45% correspondiente a la uva de mesa, un 0,18% de viñedo para uva de pasificación y, por último, un 0,08% correspondiente a los viveros de viñedo (MAGRAMA, 2014a).

En cuanto a producción, España ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con 7.480 miles de toneladas en el año 2013 solo superada por China, Italia y Estados Unidos de América (FAOSTAT, 2016).



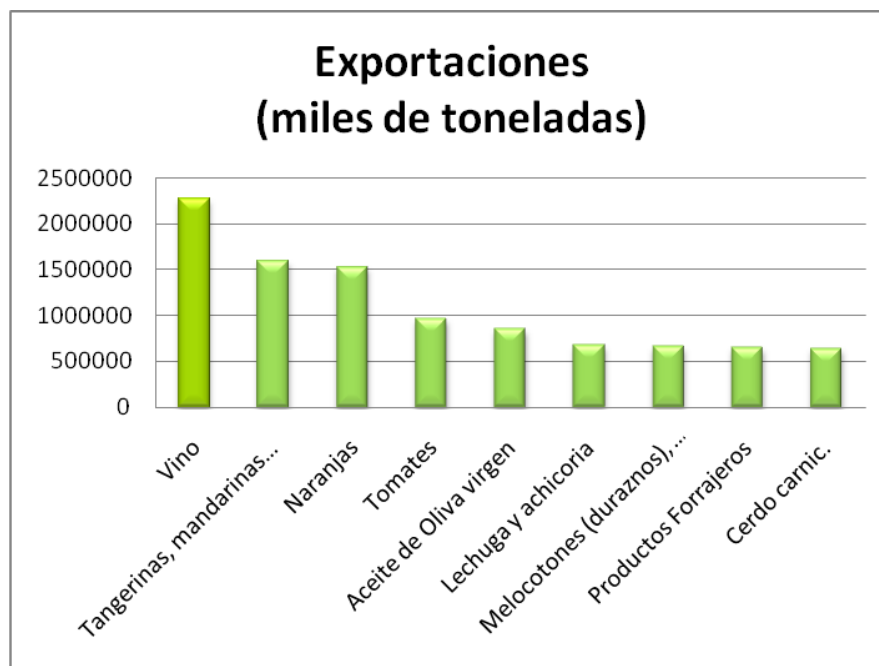
**Figura 1. Países que encabezan la producción mundial de vid en el año 2013**  
(Fuente: FAOSTAT, 2016)

Otro dato que pone sobre la mesa la relevancia del cultivo de la vid en España es su tercera posición a nivel mundial de producción de vino, con 40 millones de hectolitros, solo superada por Francia y por Italia (OIV, 2015):



**Figura 2. Principales países productores de vino en el año 2015**  
(Fuente: OIV, 2015)

Además, el vino es el producto que ocupa la primera posición en las exportaciones de productos agroalimentarios del país, con aproximadamente 22.753,92 miles de toneladas superando a otros productos como las naranjas, las mandarinas, tomates, etc. (FAOSTAT, 2011).



**Figura 3. Principales exportaciones de España**  
(Fuente: FAOSTAT, 2011)

Dentro del territorio español, la producción de uva de mesa en 2013 la lideró la región de Murcia, con 146.326 toneladas, seguida por la Comunidad Valenciana, con 87.160, Andalucía, con 16.101, seguidas de lejos por Extremadura, Castilla-La Mancha, Aragón, Canarias, Baleares, Cataluña, Madrid y Castilla y León (MAGRAMA, 2014a).

En el caso de la uva para vinificación, la región líder fue Castilla-La Mancha con una producción total muy por encima que el resto de regiones de, aproximadamente, 4.298.526 toneladas, seguida por Extremadura con una producción de 568.663 toneladas, Cataluña con 499.614 toneladas, Comunidad Valenciana con 400.950 toneladas, y con una producción inferior a las cuatrocientas mil toneladas les siguieron Castilla y León, La Rioja, Andalucía, Galicia, Aragón, Navarra, R. de Murcia, País Vasco, Madrid, Canarias, Baleares, Cantabria y el Principado de Asturias (MAGRAMA, 2014a).

Los viveros de viñedo ocupan una superficie de aproximadamente 730 hectáreas y un 0,8% de la superficie en España según datos del 2013. Como se había indicado anteriormente, se puede decir que se encuentran concentrados en unas pocas comunidades autónomas y de manera muy desigual, siendo Navarra la que más superficie concentra con 582 hectáreas, seguida por Canarias con 72, Cataluña con 60, Andalucía con 12 y Castilla-La Mancha con 4 (MAGRAMA, 2014a).

## 1.2. Los viveros de viñedo: el proceso viverístico.

Los viveros de viñedo, aunque representen tan solo un 0,08% de la superficie de vid en España, deben considerarse un punto de máximo interés para el control de plagas y enfermedades en el cultivo, debido a que son los responsables de suministrar los plantones a los agricultores y son el primer punto en el que se puede actuar para reducir o eliminar los agentes patógenos de la planta. De hecho, antiguamente las plantaciones eran francas de pie directamente originadas de sarmientos de *Vitis vinifera*, pero con la aparición de los problemas de filoxera y nematodos los agricultores requerían de portainjertos resistentes para poder llevar adelante la plantación (Hidalgo, 2002). Por ese motivo resulta tan importante conocer el proceso viverístico y los puntos más susceptibles de contaminación.

Un vivero completo se constituye por campos de pies madres para la producción de madera a multiplicar, parcelas para la producción de barbados y parcelas para la producción de plantas injerto junto a otras instalaciones auxiliares. En los viveros de planta-injerto se producen portainjertos enraizados que llevan efectuado el injerto suministrando al agricultor la plantación definitiva sin tener que recurrir a la injertación (Hidalgo, 2002).

En general, el proceso de propagación de la vid es casi idéntico en todos los viveros y se basa en la obtención de injertos a partir de plantas madre, tanto de portainjertos como de variedades. Una vez recogido en otoño o principios de invierno, el material vegetal se sumerge en agua a la que se le añaden fungicidas (o se realiza a posteriori una inmersión en dicho producto) entre 1 y 12 horas. Tras realizar un almacenamiento en frío, los esquejes se empapan nuevamente con agua durante períodos que pueden variar desde unas horas hasta unos 4 días y, finalmente, son injertados: una forma común de hacerlo es en omega. Las uniones del injerto se sumergen en parafina fundida a una temperatura de entre 70 y 75°C que puede contener reguladores del crecimiento o fungicidas que favorecerán la unión y evitarán la colonización y el desarrollo fúngico (Gramaje y Armengol, 2011).

La estratificación de los injertos se realiza posteriormente para que se produzca la soldadura del injerto y puede realizarse de manera natural en arena o de manera forzada. La estratificación en arena consiste en situar manojos pequeños de algunos injertos en posición horizontal con el injerto mirando hacia arriba y cubiertos con una espesor de

15 o 20 cm de arena procurando que ésta penetre en las estacas eliminando posibles bolsas de aire y aportando humedad de manera periódica mediante riegos finos hasta que aproximadamente a los 30 días se observa la formación del callo. En el caso de la estratificación forzada, ésta se realiza mediante un control de humedad y temperatura manteniendo el material vegetal en condiciones favorables acortando el tiempo que dura el proceso (Hidalgo, 2002) y reduciendo la mano de obra de manera significativa (Gramaje y Armengol, 2011). Los esquejes suelen envasarse en cajas junto a sustratos como vermiculita, perlita... para evitar la deshidratación de las vides. Posteriormente se introducen en cámaras húmedas durante 2 o 3 semanas dependiendo de la temperatura y de la variedad (Gramaje y Armengol, 2011; Hidalgo, 2002).

Después de la formación de los callos los injertos se retiran de las cajas y se sumergen de nuevo en cera. A continuación vuelven a sumergirse en agua fría para reducir la temperatura y puede realizarse una imbibición de la parte inferior del injerto en fungicidas (Gramaje, y Armengol, 2011).

Tras haber realizado este encerado, el injerto, se lleva a campo dónde son plantados sobre el suelo o en macetas biodegradables. Durante la primera parte del crecimiento de las plantas, las vides se riegan hasta que se haya producido el adecuado desarrollo del sistema radicular especialmente en climas cálidos y secos. Hay que tener en cuenta que debe haber un sistema de control de plagas igual que en los cultivos puesto que están sometidos a los mismos agentes (Gramaje y Armengol, 2011).

El arranque de las plantas se realiza con la caída de la hoja y se puede realizar a mano o mecánicamente con un arado con reja en forma de “U”. Posteriormente, se realiza una clasificación y una poda, legalmente hay unas características mínimas exigibles (Hidalgo, 2002).

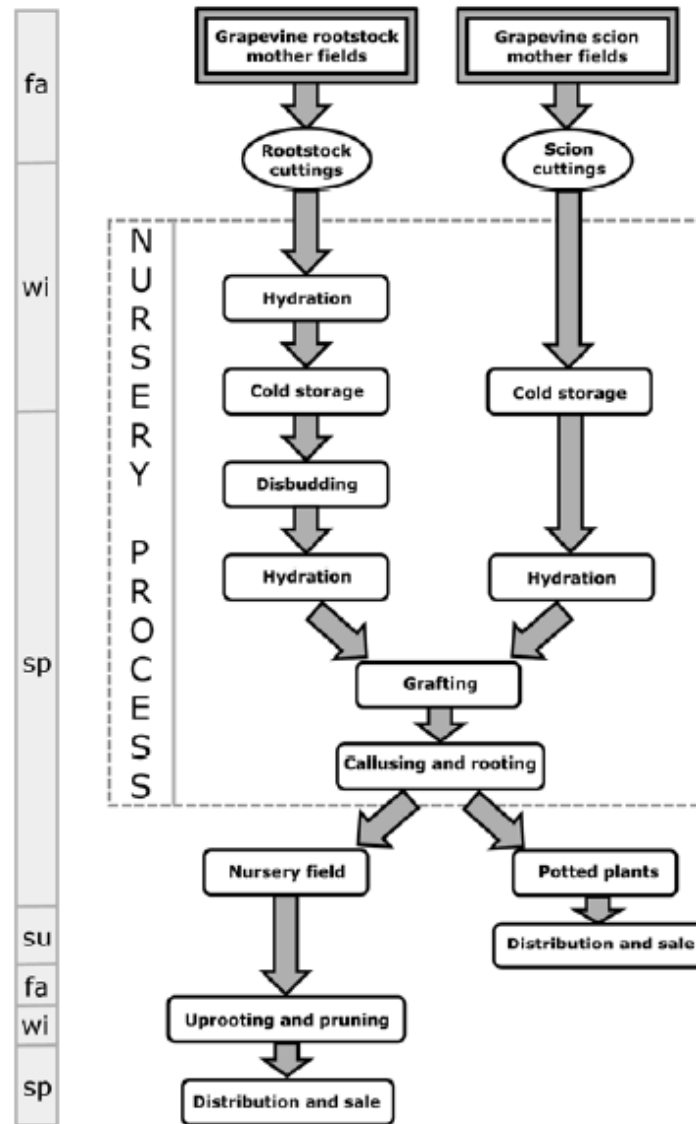


Figura 4. Diagrama que muestra de manera resumida el proceso viverístico general. (Abreviaciones: fa, otoño; wi, invierno; sp, primavera; su, verano). Las estaciones corresponden al hemisferio norte. (Fuente: Gramaje y Armengol, 2011)

### 1.3. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid

A principios de los 90 se observó un aumento de la mortalidad de plantas jóvenes de la vid en todo el mundo coincidiendo con un periodo de rápida expansión en la industria del vino (Gramaje y Armengol 2011). Este decaimiento es causado principalmente por enfermedades fúngicas de la madera (Agustí-Brisach *et al.*, 2013) que venían asociadas tradicionalmente a plantaciones adultas (Agustí-Brisach *et al.*, 2014). Esto provoca que los agricultores tengan que replantar sus parcelas comprometiendo la estabilidad en la producción de uva y de vino, y causando grandes pérdidas económicas (Gramaje y

Armengol, 2011). A este aumento de la mortalidad también han contribuido cambios en las prácticas culturales y el manejo de los viñedos, una baja calidad sanitaria del material de propagación, la prohibición de uso de muchas materias activas fungicidas como el arsenito sódico, siendo reemplazados por fungicidas menos efectivos, y la escasa protección en las heridas de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

Las enfermedades fúngicas que afectan a la madera de la vid son consideradas unas de las patologías más dañinas en este cultivo. En plantas adultas los daños causados por estos patógenos no han variado mucho, pudiéndose observar un ligero incremento de los problemas ocasionados, debido sobre todo al mayor estrés al que se someten las plantas al forzarlas para conseguir mayores producciones. En cambio, en planta jóvenes se ha observado un incremento alarmante de las afecciones (García-Jímenez, 2004). Los síntomas que pueden observarse se muestran como alteraciones internas en la madera, necrosis y pudriciones, que provocan la reducción del desarrollo con la consecuente reducción del vigor de la planta además de la detención o retraso de la brotación, el acortamiento de los entrenudos, la aparición de manchas cloróticas o marchitez de las hojas y un decaimiento generalizado de la planta que puede terminar con su muerte (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

Tradicionalmente se consideraban la yesca y la eutipiosis como las únicas enfermedades fúngicas de la madera de la vid, presentándose básicamente en viña adulta. Su control se basaba en la aplicación de arsenito sódico y podas sanitarias, cuyo objetivo era la eliminación de la madera muerta complementada, en ocasiones, con la aplicación de otros productos fungicidas. Actualmente, estas enfermedades tienen una gran incidencia en plantaciones jóvenes y, además, se han descrito nuevas enfermedades como la enfermedad de Petri, el decaimiento por *Botryosphaeria* y se conoce más sobre otras como el pie negro, las cuales causan una elevada mortalidad en las plantas en los primeros años de cultivo y constituyen las principales enfermedades fúngicas de la madera de la vid presentes en España (Agustí-Brisach *et al.*, 2014; García-Jímenez, 2004).

La yesca, característica de plantas adultas, está causada principalmente por el hongo basidiomiceto *Fomitoporia mediterranea* (MAGRAMA, 2014b) y también, aunque con menor medida, por *Stereum hirsutum* y los hongos asociados a la enfermedad de Petri (*Phaeomoniella chlamydospora* y algunas especies del género *Phaeoacremonium* y

*Cadophora luteo-olivacea*) (Sorolla *et al.*, 2016). La sintomatología se caracteriza por presentar una zona de podredumbre seca y esponjosa en la zona central del tronco de los brazos de la cepa, que queda delimitada por una línea negra dejando una zona exterior dura con puntos necróticos en los que se pueden encontrar los hongos asociados a la enfermedad de Petri. La enfermedad se puede presentar de dos formas diferentes según su evolución, una lenta y la otra rápida o apopléjica. En la lenta aparecen zonas amarillentas o rojizas en las zonas internerviales de las hojas en variedades de uva blanca o de tinta respectivamente que más tarde evolucionan en necrosis (Figura 5.A y 5.B). Además, puede provocar una pasificación prematura de los racimos. En la forma rápida o apopléjica se produce la muerte repentina de las plantas en los meses de verano (MAGRAMA, 2014b).

La eutipiosis es también característica de plantas adultas (MAGRAMA, 2014b). Está causada por el hongo ascomiceto *Eutypa lata* y produce una reducción acusada de la vida productiva del viñedo (Halleen *et al.*, 2010). En la sección transversal de la madera afectada produce una necrosis sectorial oscura y de consistencia dura (MAGRAMA, 2014b) y puede provocar un retraso en el crecimiento de la planta, la muerte de las ramas o incluso vides enteras (Halleen *et al.*, 2010). Generalmente las ramas afectadas por esta enfermedad presentan brotes pequeños con entrenudos cortos, hojas pequeñas que presentan deformaciones, manchas cloróticas y necrosis en los márgenes (Figura 5.C). Además, los racimos pueden sufrir un fuerte corrimiento (MAGRAMA, 2014b).

La enfermedad de Petri está causada por *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea*, así como numerosas especies del género *Phaeoacremonium*. Estas especies afectan a la parte basal del patrón colonizando los tejidos xilemáticos, puesto que se encuentran en el suelo (MAGRAMA, 2014b). Al realizar cortes longitudinales y transversales de la madera se pueden observar círculos oscuros alrededor de la médula ocasionados por los vasos dañados por los patógenos (Figura 5.E) y, en ocasiones, se pueden presentar exudaciones gomosas en la zona (Sorolla *et al.*, 2016). En las cepas, la enfermedad de Petri, ocasiona un retraso en el desarrollo, una disminución de los entrenudos de los brotes con hojas pequeñas cloróticas o incluso la muerte (Sorolla *et al.*, 2016).

El decaimiento por *Botryosphaeria* está causado por especies de esta misma familia entre las que se destacan *Dipodia seriata* y *Neofusicoccum parvum*. Los síntomas



observados en esta enfermedad pueden variar de una región a otra, pero los más típicos son la aparición de chancros, mortalidad de brotes, hojas cloróticas, pudrición del fruto y necrosis sectorial en la madera, de consistencia dura, que suele afectar a uno solo de los brazos de la cepa causando su desecación y muerte (Figura 5.D) (Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Gramaje y Armengol 2011; MAGRAMA, 2014b). En ocasiones pueden suponer el fracaso de la unión injerto-patrón. En los casos en los que la planta está sometida a estrés los efectos son especialmente graves, por ese motivo las pérdidas más graves debidas a esta enfermedad se producen en vides mayores de 8 años (Gramaje y Armengol, 2011).

El Pie negro está causado por especies que pertenecen a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria* y *Neonectria* (Lombard *et al.*, 2014; MAGRAMA, 2014b; Sorolla *et al.*, 2016). Este patógeno afecta básicamente al sistema radicular y a la parte basal del patrón produciendo sectores necróticos característicos que dan nombre a la enfermedad (Figura 5.F). La reducción de la masa radicular implica una brotación débil en la parte aérea con hojas pequeñas y cloróticas (Gramaje y Armengol, 2011; Sorolla *et al.*, 2016).

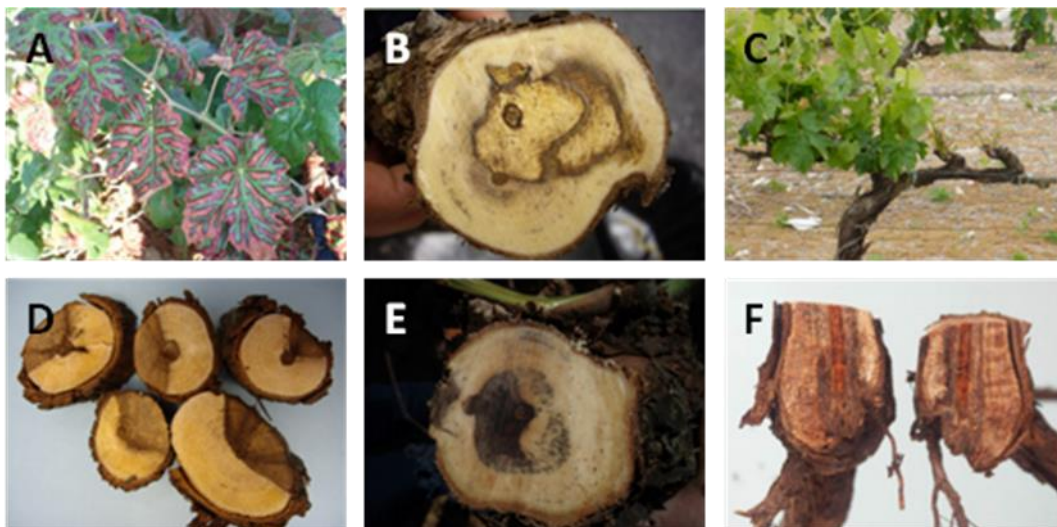


Figura 5. A, Coloración y necrosis internervial producidos por yesca. B, Descomposición de la madera producida por *Fomitiporia mediterranea*. C, Sintomatología característica de eutipiosis, retraso y desarrollo anormal de las brotaciones. D, Necrosis sectorial en los brazos causada por eutipiosis y por decaimiento por *Botryosphaeria*. E, Necrosis sectorial y xilemática, características de la enfermedad de Petri. F, Necrosis y muerte de raíces en la base del patrón de una planta joven característica del pie negro (Fuente: MAGRAMA, 2014).

Es importante conocer el medio de dispersión de los hongos que producen enfermedades en la madera. En el caso de las especies relacionadas con la yesca, la eutipiosis y el decaimiento por Botryosphaeriaceae, la dispersión se produce mediante esporas a través del viento y de la lluvia que infectan a la planta penetrando a través de heridas de poda en la parte aérea. Los hongos que causan las enfermedades del pie negro se caracterizan por habitar el suelo y la infección se produce a través de heridas en las raíces o en la parte de la base del patrón en contacto con el suelo. Por último, en el caso de la enfermedad de Petri, en general, se encuentra en el suelo pero también puede dispersarse mediante esporas por el viento o el agua de la lluvia, infectando la planta por las heridas en raíces o en la parte basal o en las heridas de poda respectivamente (Agustí-Brisach *et al.*, 2013; MAGRAMA, 2014).

Los hongos que producen estas enfermedades se pueden encontrar tanto en el suelo de las parcelas como en plantas hospedantes y diversos estudios han confirmado que la propagación de plantas en viveros puede ser una fuente de diseminación de estos patógenos. Por un lado, las plantas madre de las que se toma el material vegetal pueden estar ya infectadas y, por otro lado, los plantones pueden infectarse durante el proceso de producción de planta injertada en el vivero obteniéndose, en los dos casos, plantones con las enfermedades que en poco tiempo empezaran a verse afectados por estas patologías (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

#### **1.4. Control de las enfermedades producidas por los hongos de la madera en la vid.**

##### 1.4.1. La termoterapia con agua caliente.

En el caso de la legislación española, los hongos que producen las enfermedades de la madera de la vid no están contemplados en la normativa de producción de planta certificada (Real Decreto 208/2003, B.O.E 25 de febrero de 2003; Orden APA/2474/2006, B.O.E 27 de julio de 2006; Real Decreto 170/2011, B.O.E 12 de febrero 2011), que solo contempla que el material de multiplicación y las cepas madre deben estar libres de *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Phomopsis* sp., *Eutypa armeniacae* y *Stereum* sp. De manera que el problema puede agravarse debido a la falta de control sobre los hongos de la madera.

Numerosas investigaciones en diversos lugares del mundo han demostrado que en algunas fases del proceso viverístico, como el desyemado, el injertado, el enraizamiento en campo, etc. pueden facilitar la entrada de patógenos y de ellas se desprende la necesidad de implementar técnicas de manejo en el vivero para reducir el riesgo de infección o el mantenimiento a niveles bajos en la producción de plántones ya que no existen estrategias de control que permitan erradicar la enfermedad (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

Una de las medidas de control que está obteniendo muy buenos resultados es la incorporación de la termoterapia con agua caliente en el proceso de producción de planta. Esta técnica, a pesar de no ser completamente eficaz, reduce de manera significativa buena parte de la flora patógena de la madera de la vid (Luque *et al.*, 2014; Gramaje y Armengol, 2011).

Respecto a la temperatura del agua y el tiempo de duración del tratamiento se ha observado que un tratamiento de 50°C y 30 minutos (el considerado estándar) podría ser suficiente, aunque diversas investigaciones han concluido que la tolerancia de las plantas y de los patógenos depende de diversos factores como: el clima de procedencia de los esquejes (por ejemplo en Nueva Zelanda con tratamientos a 50°C obtienen resultados satisfactorios debido a la mayor susceptibilidad de los patógenos y a la menor tolerancia de las plantas a altas temperaturas, mientras que en España son más efectivos los tratamientos a 53°C) (Gramaje y Armengol, 2011); la variedad de la vid (por ejemplo, se sabe que la variedad Pinot noir es más sensible que otras como Chardonnay, Merlot o Cabernet); el patógeno presente en el material vegetal (Para hongos asociados al pie negro basta con 50°C, en cambio, los relacionados con la enfermedad de Petri requieren de temperaturas entre 51-53°C) (Berstch *et al.*, 2012; Gramaje *et al.*, 2008), e incluso en algunas experiencias se ha visto efectiva la realización de dos tratamientos de termoterapia: uno a 54°C durante 5 minutos, encargado del control de los patógenos externos, y uno a 50°C durante 30-40 minutos, que serviría para el control de patógenos internos (Waite y Morton, 2007; Gramaje *et al.*, 2009).

En las condiciones de cultivo españolas se ha demostrado que es posible un tratamiento de 53°C durante 30 minutos sin que se ocasionen daños en la planta y reduciendo de manera significativa la presencia de los patógenos que causan las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).

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

En el año 2015, se realizó un primer estudio sobre el efecto que los tratamientos por termoterapia con agua caliente pueden tener sobre la micoflora total de plantas de vid injertadas (Alfonso, 2015). En este trabajo se analizaron, inmediatamente tras la aplicación de tratamientos por termoterapia por agua caliente, plantas de vid injertadas que fueron sometidas a un tratamiento a 50°C durante 30 minutos o a 53°C durante 30 minutos. Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos en estos tratamientos con plantas sin tratar.

Los análisis mostraron que la micoflora total y su diversidad disminuyeron tras la aplicación de los tratamientos de termoterapia con agua caliente a las plantas de vid injertadas. Si nos centramos en los patógenos de la madera de la vid se observaron resultados diferentes. Algunas especies como *Dactylonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri*, *Neofusicoccim parvum* y *Pa. chlamydospora* vieron reducida su presencia por lo tratamientos de termoterapia consiguiendo su control, pero especies como *Diplodia seriata*, *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y *Pm. minimum* no mostraron tal comportamiento, ya que sobrevivieron tras el tratamiento, aunque con una menor incidencia. Además se observó que *Cadophora luteo-olivacea* toleró los tratamientos con agua caliente.

Dicho trabajo se realizó analizando plantas injertadas inmediatamente después del tratamiento, pero resultaría interesante también realizar un trabajo similar para el seguimiento de estas plantas tras un ciclo de cultivo en campo y evaluar la efectividad de los tratamientos con agua caliente a más largo plazo.

## 2. Justificación y objetivos

Teniendo en cuenta la información expuesta anteriormente, los objetivos del presente trabajo son:

-Estudiar el efecto de la aplicación de tratamientos de termoterapia con agua caliente a 50 y 53 °C sobre la micoflora total presente en la madera en plantas de vid injertadas en vivero y tras un ciclo de cultivo en el campo, comparándolas con plantas sin tratar.

-En las plantas anteriores estudiar particularmente la supervivencia de hongos patógenos de la madera, para demostrar la efectividad de los tratamientos con agua caliente para controlar estas enfermedades.

-Determinar la evolución de la micoflora presente en las plantas injertadas inmediatamente después del tratamiento con agua caliente y después de un año de cultivo, comparando los resultados del presente trabajo con los obtenidos en el Trabajo Final de Máster de Jesús Alfonso Crespo titulado “Efecto de los tratamientos por termoterapia con agua caliente sobre la micoflora presente en plantas de la vid injertadas” en el que se hizo un estudio similar con las mismas plantas antes de que éstas fueran plantadas en campo.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material vegetal

Las plantas utilizadas en el experimento eran plantas injertadas y correspondían al patrón 110 Ritcher con la variedad Tintorera. Éstas fueron sometidas a tratamientos de termoterapia con agua caliente (explicados más adelante) en la primavera de 2015 y plantadas inmediatamente en un campo situado en Aiello de Malferit en el que permanecieron durante una campaña de cultivo. Posteriormente, se procedió a la recogida de las mismas en diciembre de 2015.

El número total de plantas utilizado fue de sesenta, divididas en tres tratamientos según lo detallado a continuación:

-20 plantas control (no tratadas por termoterapia con agua caliente).

-20 plantas sometidas a un tratamiento de termoterapia con agua caliente a 50°C durante 30 minutos. Es un tratamiento recomendado de forma habitual en la vid para el control de diferentes patógenos (Gramaje y Armengol, 2011).

-20 plantas sometidas a un tratamiento con agua caliente a 53°C durante 30 minutos. Tratamiento recomendado contra hongos de la madera de la vid en las condiciones de España, sin que se comprometa la viabilidad del material vegetal (Gramaje *et al.*, 2008).

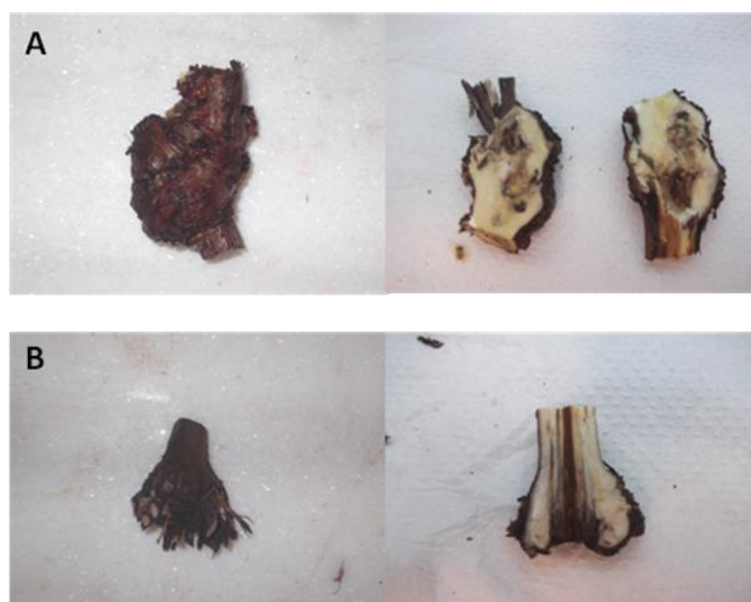
Antes de realizar el tratamiento las plantas fueron introducidas en bolsas de malla en grupos de 20 y se sumergieron en agua a una temperatura de 25°C durante una hora para hidratarlas. Posteriormente, se realizaron los tratamientos correspondientes en un tanque de termoterapia situado en el invernadero de Patología Vegetal de la ETSIAMN en la UPV.

La capacidad del tanque utilizado era de 1.000 litros y su funcionamiento se basa en el uso de resistencias para calentar el agua y agitadores que tienen como objetivo mantener la temperatura uniforme. La regulación de las temperaturas se consigue utilizando sondas térmicas provistas de un termostato de regulación que tiene una sensibilidad térmica de un grado centígrado.

Tras finalizar cada tratamiento, el material vegetal se sumergió de nuevo en agua fría con el objetivo de detener el calentamiento y enfriarlo.

### **3.2. Aislamiento fúngico**

Las plantas, recogidas en diciembre de 2015 después de un ciclo de cultivo, se lavaron con agua para eliminar la tierra adherida y se retiró la cera de la zona del injerto. En cada una de las plantas, se cortaron fragmentos de, aproximadamente, 3 cm de longitud de la zona basal del patrón y de la zona del injerto (Figura 6). Posteriormente, estos fragmentos se desinfectaron externamente sumergiéndolos durante unos segundos en alcohol de 96°C y flameando.

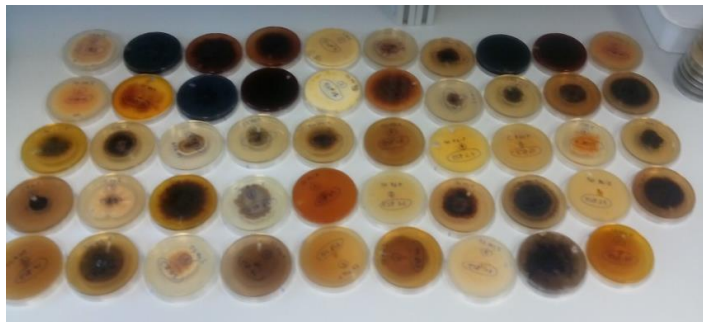


**Figura 6. A, Zona del injerto (izquierda) y su corte longitudinal (derecha). B, Zona basal de la planta (izquierda) y su corte longitudinal (derecha).**

Tras la desinfección se procedió a extraer de cada fragmento 15 porciones de madera de unos pocos milímetros que presentaran algún tipo de daño o necrosis y se sembraron en una placa Petri con medio de cultivo agar extracto de malta con la adición de sulfato de estreptomicina (MEAS). Concretamente el medio estaba compuesto por 20 gramos de extracto de malta, 15 gramos de agar, 0,5 gramos de sulfato de estreptomicina y 1 litro de agua destilada.

Las placas Petri se introdujeron en una estufa a 25°C de temperatura en oscuridad durante 14-21 días para permitir el crecimiento de colonias fúngicas. Una vez se produjo el crecimiento de las colonias, se extrajeron puntas hifales que se repicaron en un medio patata-dextrosa-agar (PDA) compuesto por 39 gramos de patata-dextrosa-agar

y 1 litro de agua destilada. Las colonias repicadas se dejaron a 25°C en oscuridad durante unos 15 días para ser identificadas posteriormente (Figura 7).



**Figura 7. Colonias repicadas preparadas para la identificación.**

### **3.3. Identificación de las colonias**

#### 3.3.1. Identificación morfológica

Tras la incubación se procedió a realizar una identificación morfológica tentativa de las colonias fúngicas crecidas en el medio PDA. Ésta se basaba en observar el aspecto de las colonias (color, tipo y abundancia de micelio, etc.) y en realizar preparaciones al microscopio para la identificación morfológica de las estructuras específicas de esporulación de los diferentes hongos obtenidos.

#### 3.3.2. Identificación molecular

La identificación de las colonias obtenidas se confirmó por identificación molecular, utilizando como primera aproximación la secuenciación de la región ITS (“internal transcribed spacer”). En aquellos casos donde esta región no era concluyente para la identificación, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de algunos genes como el del factor de elongación (EF) para hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, el de la beta-tubulina (BT) para *Phaeoacremonium* y el de la histona 3 (H3) para aislados de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* (Gardes y Bruns, 1993; Cabral *et al.*, 2012).

El ADN de los cultivos se extrajo por dos metodologías, utilizando micelio fúngico de los cultivos crecidos en PDA durante 2 a 3 semanas a 25°C en la oscuridad. En primer lugar, se realizó una extracción rápida para la cual se tomó una pequeña cantidad de micelio del hongo y se introdujo en 20µl de NaOH 25mM, se calentó a 100°C durante 15 minutos en un termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research Inc.,



MA, USA). Posteriormente se añadieron 20µl de Tris-HCl 40mM. El segundo método utilizado fue la extracción por medio del kit EZNA (Omega Bio-tek, Doraville, GA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

**Tabla 1. Cebadores utilizados para la identificación molecular junto a su secuencia, su temperatura de anillamiento y la región amplificada.**

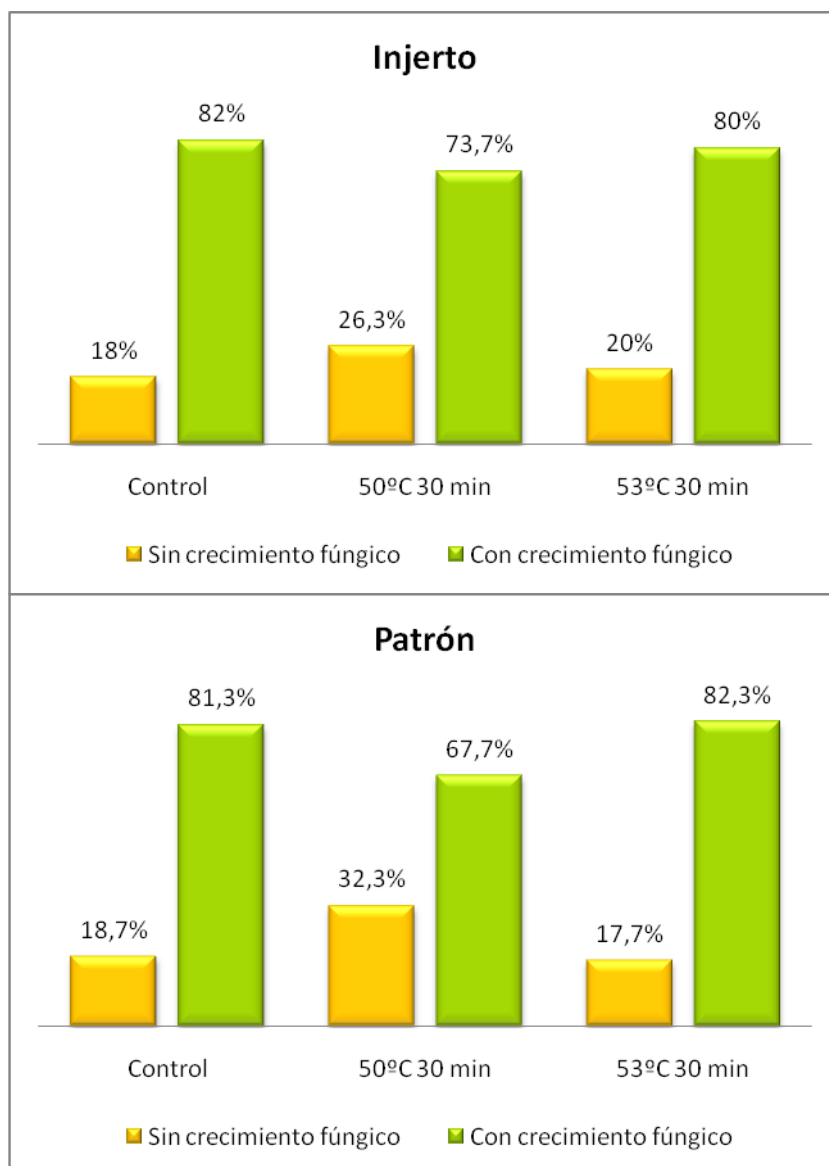
Cebador	Secuencia	Ta	Región amplificada
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	55	Beta tubulina
T1 (con Bt2b)	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	55	
EF1F	TGCGGTGGTATCGACAAGCGT	55	Factor de elongación
EF2R	AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG	55	
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55	Región ITS
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55	
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG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

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

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

## 4. Resultados

Los resultados obtenidos tras la identificación de las colonias se presentan a continuación. En la Figura 8 se puede observar el porcentaje de puntos de aislamiento, que presentaron o no presentaron crecimiento fúngico, para los distintos tratamientos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) y para las dos zonas en las que se realizaron los análisis en las plantas (la zona del injerto y la zona de la base del patrón), después de un ciclo de cultivo:



**Figura 8.** Porcentaje de puntos de aislamiento, con o sin crecimiento fúngico, en la zona del injerto y de la base del patrón para los tres tratamientos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) en plantas de vid injertadas tras un ciclo de cultivo. En cada tratamiento se extrajeron 300 puntos de aislamiento para las zonas de injerto y otros 300 para la zona del patrón (20 plantas por tratamiento y 15 puntos de aislamiento por planta y zona de análisis).

En la Figura 8 podemos ver que tras mantener las plantas en cultivo durante un año no se observan grandes diferencias entre tratamientos ni en la zona del injerto ni en la zona del patrón.

En la zona del injerto, los valores de los puntos con crecimiento fúngico fueron similares para todos los tratamientos obteniendo un valor del 73,7% en el tratamiento de 50°C durante 30 minutos, del 80% en el tratamiento a 53°C y 30 minutos y del 82,0% en el caso de las plantas control. En el caso del patrón, se observa el valor más bajo en el tratamiento a 50°C 30 minutos con un 67,7% de puntos con crecimiento fúngico, mientras que este valor fue del 81,3% en las plantas sin tratar y, en el caso del tratamiento a 53°C 30 minutos, el valor de los puntos con crecimiento fúngico se situó en el 82,3%.

En la Tabla 2, se puede observar el porcentaje de infección tanto en injerto como en patrón para cada uno de los hongos detectados (se calcula el porcentaje que aparece de estos hongos respecto a los puntos de aislamiento totales), así como el número de plantas infectadas con cada hongo en cada tratamiento. Tal y como se ha indicado en el procedimiento experimental, para la identificación de aislados se usaron técnicas tanto morfológicas como moleculares. Debido a las limitaciones que presentan estas técnicas de identificación hubo colonias fúngicas en las que no se pudo llegar a identificar a nivel de especie, por lo que sólo se indica el género. En el caso de los aislados que no pudieron identificarse se presentan en la Tabla 2 como “No identificado(s)”.

Sin contar los hongos no identificados, en total se identificaron treinta géneros o especies de hongos en los distintos tratamientos. En las plantas que no recibieron tratamiento (control), se identificaron un total de 20 especies o géneros (14 en el caso del injerto y 16 en el caso del patrón), en el caso de las plantas sometidas a 50°C y 30 minutos, el número de especies o géneros encontrados fue de 21 (concretamente se encontraron 12 en el injerto y 18 en el patrón). Por último en las plantas sometidas al tratamiento a la temperatura más alta, el de 53°C durante 30 minutos el número total de especies y géneros fue de 20 (16 en el caso del injerto y 14 en el caso del patrón).



Tabla 2. Continuación.

Especies fúngicas	Control				50°C 30 min.				53°C 30 min.			
	Injerto		Patrón		Injerto		Patrón		Injerto		Patrón	
	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección
<i>Mortierella alpina</i>	3	2,7	7	7,3	-	-	1	2,3	1	0,3	1	1
<i>Mucor</i> spp.	1	0,3	3	3,7	-	-	2	0,7	-	-	2	1,7
<i>Neofusicoccum parvum</i>	12	14,3	1	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	2	1	1	2,3	-	-	1	2	1	2	2	1
<i>Penicillium</i> spp.	2	1,7	5	2,7	4	3,3	4	2	7	6,3	5	2,7
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	5	3,3	2	1,3	-	-	7	4,7	3	3	3	1,3
<i>Phomopsis viticola</i>	2	2	-	-	1	0,3	-	-	1	0,7	-	-
<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	-	-	-	-	1	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>Psathyrella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	2	1,7	-	-	2	1
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	-	-	-	-	-	-	1	2,7	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia</i> spp.	-	-	4	4,7	-	-	1	0,3	-	-	3	3
<i>Rhizopus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,7	1	0,3
<i>Sarocladium kiliense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,7	-	-
<i>Scytalidium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Trichoderma</i> spp.	-	-	3	5,3	2	4,7	4	1,3	1	2,7	1	4,7
No identificado(s)	1	0,7	1	0,3	1	0,7	4	4,3	-	-	2	4

Como se puede observar en la Tabla 2, el número de plantas infectadas y los porcentajes de infección de los distintos géneros y especies de hongos tras el tratamiento y un ciclo de cultivo en campo fue variable.

Hay algunos casos como por ejemplo *Alternaria* spp. en los que se produjo una disminución de su presencia e infección en las plantas con tratamiento, pasando de 6 plantas con un 7,33% de infección en injerto en las plantas control a 3 plantas y un 2% de infección en el caso del tratamiento a 50°C, y a ninguna infección en las plantas tratadas a 53°C. Otro ejemplo en el que se observa una disminución de la presencia y de la infección es el caso de *Cadophora malorum* que en el grupo de plantas control está presente en una planta representando un 1,33% de infección y con el tratamiento a 50°C la presencia de este hongo se reduce a un 0,33%.

En otros casos, como *Fusarium* spp., hay un aumento de su presencia según aumenta la temperatura de los tratamientos. En este caso, en el tratamiento control se encuentran afectadas 15 plantas en el injerto, representando un 27,67% de infección y 15 plantas en patrón que representan un 35,33% de infección. En las plantas tratadas a 50°C se observan, en el injerto, 18 plantas afectadas con una infección del 43,67% y, en el patrón, 18 plantas afectadas con una infección del 37,33%. Por último, en el tratamiento de 53°C se observan 17 plantas en injerto con un 42,33% de infección y 16 plantas en el patrón con un 56,33% de infección. Finalmente, pueden observarse otros hongos en los que, a pesar de no observarse presencia ni en el control ni en el tratamiento de 50°C, sí que aparecen en el tratamiento a 53°C como es el caso de *Rhizopus* spp., *Sarocladium kiliense* y *Scytalidium* spp.

En el caso de los hongos que causan enfermedades de la madera en la vid, para facilitar la discusión posterior de los resultados éstos se muestran por separado en la Tabla 3 y con la misma información que la Tabla 2 (el número de plantas en los que se detectó cada patógeno y el porcentaje de puntos de aislamiento en los que se aisló cada hongo respecto al total de puntos de aislamiento realizados). En total se identificaron un total de 8 especies pertenecientes a este grupo de hongos patógenos. Concretamente los que se encontraron fueron: *Botryosphaeria dothidea*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Dactylonectria alcacerensis*, *Dactylonectria torresensis*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium minimum* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Con los datos de la Tabla 3 también se elaboraron las Figuras 6 y 7, para facilitar la

comprensión de los resultados mediante gráficas en las que se representan tanto el número de plantas infectadas como el porcentaje de infección de este tipo de hongos.

En el caso de la zona de injerto, Tabla 3 y Figura 6, en los hongos de la madera el comportamiento también difiere entre los distintos géneros y especies. En el caso de *B. dothidea* se observa que la infección se presenta solamente en el caso del tratamiento a la temperatura más alta, 53°C, estando presente este hongo en 2 plantas y en el 4,3% de los puntos de aislamiento, mientras que en el tratamiento control y en el de 50°C está ausente. *Cadophora luteo-olivacea* aparece en el tratamiento control (una planta infectada y un 0,3% de los puntos de aislamiento), mientras que en el tratamiento de 50°C no se detectó, pero vuelve a encontrarse en el tratamiento de 53°C con el mismo porcentaje de infección que el tratamiento control (una planta y 0,3% de los puntos de aislamiento). El caso de *D. alcacerensis* es similar al caso de *B. dothidea*, solo se detectó en el tratamiento de 53°C (concretamente una planta y en un 0,3% de los puntos de aislamiento). La especie *D. torresensis* no se detectó en la zona de injerto. *Diplodia seriata* solo se encontró en el tratamiento de 50°C (concretamente afectando a 5 plantas y representando un 6,7% de los puntos de aislamiento), pero estuvo ausente tanto en el control como en el tratamiento a 53°C. *Neofusicoccum parvum* se detectó en el tratamiento control de una manera bastante notable, concretamente con 12 plantas infectadas y un 14,3% de infección, pero en los tratamientos con agua caliente, tanto a 50 como a 53°C, no se detectó su presencia. *Phaeoacremonium minimum* se aisló en el tratamiento control afectando a 5 plantas y representando un 3,3% de los aislados, no se aisló en el tratamiento de 50°C y sí que se detectó en el tratamiento de 53°C afectando a 3 plantas y representando un 3% del total de los puntos de aislamiento. Por último, *Pa. chlamydospora* se aisló en el tratamiento control afectando a 2 plantas representando un 1% del total de los puntos de aislamiento y en el tratamiento de 53°C se observó una planta afectada con un 2% de infección.

En el caso de la zona de la base del patrón, si observamos la Tabla 3 y la Figura 7, el comportamiento de los hongos patógenos de la madera también ha sido variable. *B. dothidea* no se presentó en ningún tratamiento. La especie *C. luteo-olivacea* se detectó únicamente en el tratamiento de 53°C afectando a una planta y representando un 0,3% de los puntos de aislamiento. *D. alcacerensis* tuvo el mismo comportamiento en los tres tratamientos, una planta infectada y representó un 0,3% de los puntos de aislamiento. La especie *D. torresensis* se encontró en el tratamiento control y de manera notable,

afectando a 7 plantas y representando un 8% del total de los puntos de aislamiento. En cambio, en las plantas tratadas con termoterapia no se encontró infección por este patógeno. *D. seriata* se aisló únicamente en el caso del tratamiento a 50°C en una planta y representando tan solo el 0,3% de los puntos de aislamiento. La especie *N. parvum* se encontró en el tratamiento control afectando a una planta y representando un 1,3% del total de los puntos de aislamiento, en cambio, no se aisló en las plantas tratadas con termoterapia. El caso de *Pm. minimum* difiere del anterior, ya que se aisló en el tratamiento control (una planta y 1,3% de los puntos de aislamiento), en el tratamiento a 50°C (7 plantas y 4,7% de los puntos de aislamiento) y en el tratamiento a 53°C (3 plantas y 1,3% de los puntos de aislamiento). Por último, en el caso de *Pa. chlamydospora* se observó una planta afectada en el tratamiento control en un 2,7% de los puntos de aislamiento, una planta en el tratamiento de 50°C con un 2% de infección y en el tratamiento de 53°C 2 plantas en un 1% de los puntos de aislamiento.



Tabla 3. Número de plantas infectadas y porcentaje de puntos de aislamiento que pertenecen los hongos de la madera de la vid para los tres tratamientos descritos (control, 50°C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos) para la zona del injerto y para la zona del patrón. En total se realizaron 300 puntos de aislamiento por cada tratamiento y zona (15 puntos de aislamiento por 20 plantas).

Especies fúngicas	Control				50°C 30 min.				53°C 30 min.			
	Injerto		Patrón		Injerto		Patrón		Injerto		Patrón	
	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección	n° Plantas	% Infección
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4,3	-	-
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	1	0,3	-	-	-	-	-	-	1	0,3	1	0,3
<i>Dactylonectria alcacerensis</i>	-	-	1	0,3	-	-	1	0,3	1	0,3	1	0,3
<i>Dactylonectria torresensis</i>	-	-	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodia seriata</i>	-	-	-	-	5	6,7	1	0,3	-	-	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i>	12	14,3	1	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	5	3,3	2	1,3	-	-	7	4,7	3	3	3	1,3
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	2	1	1	2,3	-	-	1	2	1	2	2	1

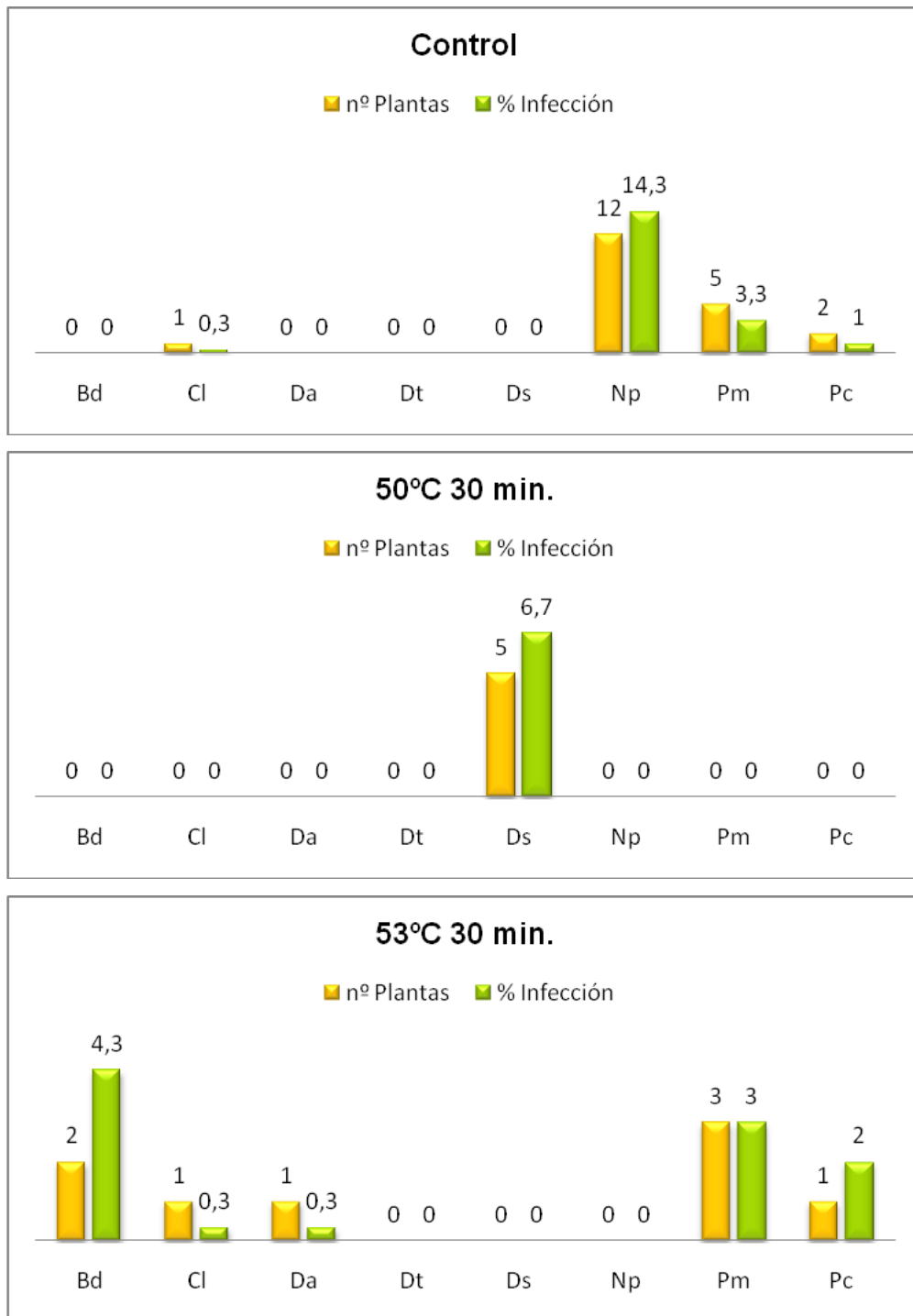


Figura 9. Zona del injerto. Número de plantas en las que se aislaron los diferentes hongos de la madera de la vid identificados (Bd: *Botryosphaeria dothidea*; Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Da: *Dactylonectria alcacerensis*; Dt: *Dactylonectria torresensis*; Ds: *Diplodia seriata*; Np: *Neofusicoccum parvum*, Pm: *Phaeoacremonium mínimum* y Pc: *Phaeoconiella chlamydospora*) y su porcentaje de aislamiento respecto a todos los puntos en los distintos tratamientos (Control, 50°C 30 minutos y 53°C 30 minutos). Se han evaluado para cada tratamiento un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas y 15 puntos de aislamiento por planta).

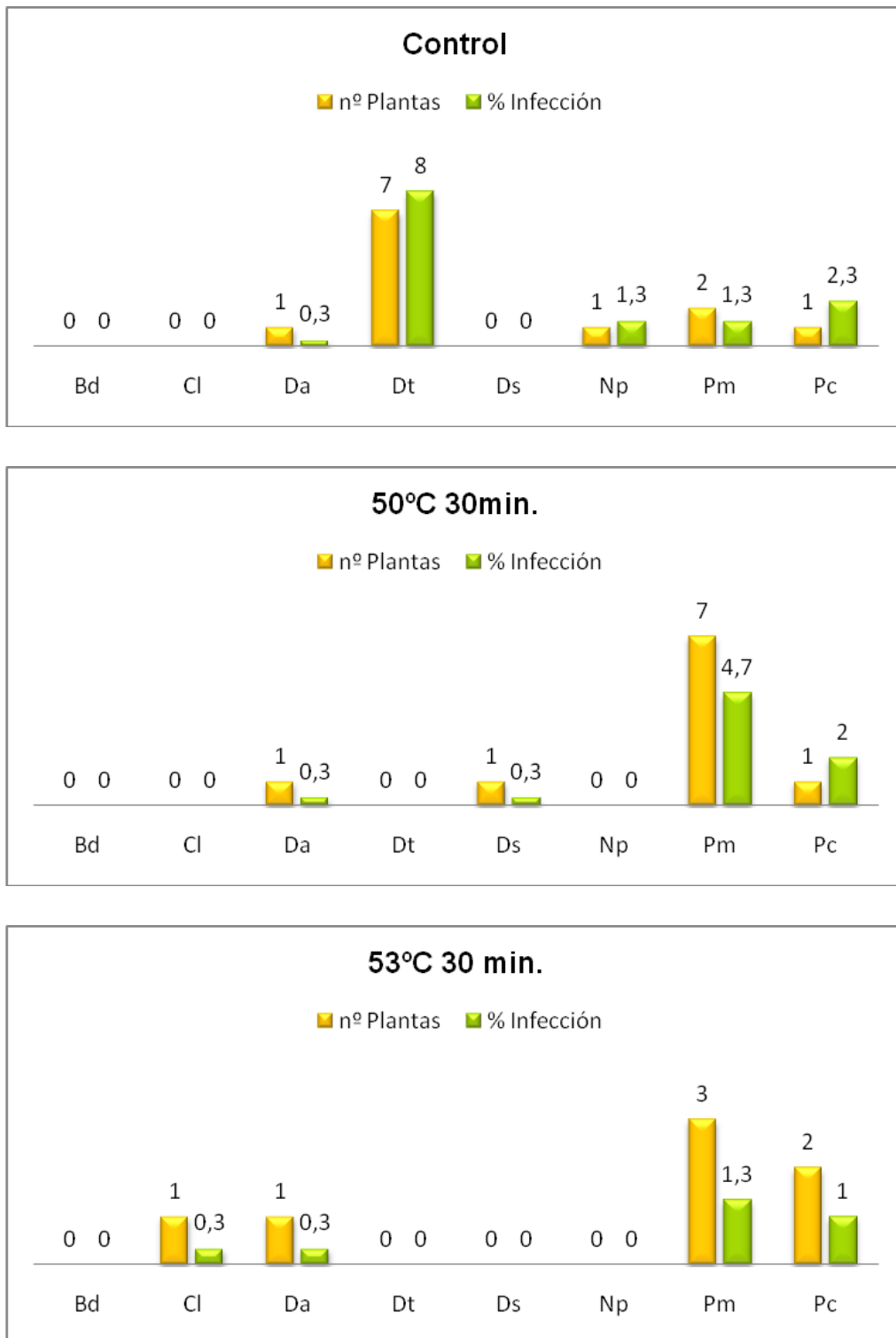


Figura 10. Zona de la base del patrón. Número de plantas en las que se aislaron los diferentes hongos de la madera de la vid identificados (Bd: *Botryosphaeria dothidea*; Cl: *Cadophora luteo-olivacea*; Da: *Dactylonectria alcacerensis*; Dt: *Dactylonectria torresensis*; Ds: *Diplodia seriata*; Np: *Neofusicoccum parvum*, Pm: *Phaeoacremonium mínimum* y Pc: *Phaeomoniella chlamydospora*) y su porcentaje de aislamiento respecto a todos los puntos en los distintos tratamientos (Control, 50°C 30 minutos y 53°C 30 minutos). Se han evaluado para cada tratamiento un total de 300 puntos de aislamiento (20 plantas y 15 puntos de aislamiento por planta).

## 5. Discusión

En este apartado, en primer lugar se van a analizar los resultados obtenidos en este trabajo, descritos anteriormente, con el objetivo de determinar la micoflora total presente en plantas injertadas de vid procedentes de vivero, tras la aplicación de tratamientos por termoterapia y un ciclo de cultivo en campo.

Después, se realizará una comparación de los mismos con los obtenidos en el Trabajo Fin de Máster de Jesús Alfonso Crespo, titulado “Efecto de los tratamientos por termoterapia con agua caliente sobre la micoflora presente en plantas de vid injertadas”, presentado en el año 2015, con el objetivo de comparar la evolución de micoflora presente en las viñas inmediatamente después del tratamiento por agua caliente y después de una campaña de cultivo en campo.

### 5.1. Micoflora en las plantas después de un ciclo de cultivo

Con los datos obtenidos en este trabajo se ha observado que las distintas especies fúngicas detectadas presentan comportamientos diferentes que se explican a continuación.

Si nos fijamos en la micoflora total, lo primero que se puede comentar es que tanto en el tratamiento control como en los tratamientos de 50 y 53°C durante 30 minutos el porcentaje total de los puntos de aislamiento con crecimiento fúngico no es muy diferente. Concretamente se obtuvieron resultados de un 82%, 73,6% y un 80%, respectivamente para los tratamientos (Control, 50 °C durante 30 minutos y 53°C durante 30 minutos). Si las distintas especies fúngicas se comparan individualmente, los resultados de aislamiento son variables entre las plantas control y los tratamientos por termoterapia, es decir, algunas especies aumentan su porcentaje de aislamiento y en otras éste disminuye. Esto podría ser debido por un lado al efecto del tratamiento por termoterapia que ha sido diferente para cada especie y, además, a que durante ese año de cultivo tras el tratamiento las plantas pueden haber sido colonizadas por hongos que permanecen en el campo en el suelo o que pueden producir infecciones en la parte aérea de la planta. Estos factores harían necesario un estudio más detallado con el fin de conocer qué hongos han sido más afectados por los tratamientos y qué ha ocurrido con los diferentes tratamientos una vez en campo.

Si nos centramos en el grupo de hongos patógenos de la madera de la vid, observamos también un comportamiento diferente para las distintas especies que se detallan a continuación:

En el caso de los hongos causantes de la enfermedad de Petri, encontramos *C. luteo-olivacea*, *Pm. minimum* y *Pa. chlamydospora*. *Cadophora luteo-olivacea* se detectó en plantas con un tratamiento de 53°C durante 30 minutos tanto en la zona del injerto como en la zona basal, cosa que resulta coherente con la bibliografía ya que hay experiencias en las que se indica que esta especie puede soportar tratamientos de hasta de 54°C durante 60 minutos (Gramaje *et al.*, 2010). *Phaeoacremonium minimum*, apareció tanto en las plantas control, como en las tratadas tanto a 50°C como a 53°C, y también tanto en la zona del injerto como en el patrón, aunque se puede observar una ligera disminución en el porcentaje de infección conforme el tratamiento aumenta de temperatura. Este comportamiento ya se observó en un estudio realizado por Gramaje *et al.* (2008) en el que distintas especies de *Phaeoacremonium* se sometieron a tratamientos de termoterapia con agua caliente a distintas temperaturas durante tiempos diferentes. Estos autores observaron una disminución de la viabilidad de *Phaeoacremonium*, ligada a un aumento de la severidad del tratamiento, demostrándose, también, que los hongos pertenecientes a este género pueden soportar temperaturas de hasta 54°C. Otra experiencia realizada por Gramaje *et al.* (2010) concluyó que era necesario desarrollar tratamientos de termoterapia con agua caliente a alta temperatura para poder eliminar tanto *C. luteo-olivacea* como *P. minimum*. En el caso de *Pa. chlamydospora*, se observa su presencia, aunque a bajos niveles, tanto en el tratamiento control como en el tratamiento a 53°C. Experiencias anteriores evidencian el control de esta especie con tratamientos a 53°C Gramaje *et al.* (2010), el motivo de que se observara este hongo en el tratamiento a 53°C respondería probablemente a una reinfección en campo.

En el caso de los hongos causantes del decaimiento por *Botryosphaeria*, en este trabajo se encontraron las especies *B. dothidea*, *D. seriata* y *N. parvum*. *Botryosphaeria dothidea* sólo se detectó en el tratamiento de 53°C y 30 minutos en la zona del injerto y en dos plantas, causando un 4,3% de infección. Experiencias realizadas por Elena *et al.* (2015) demostraron que, con un aumento de las temperaturas, los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* reducen su viabilidad y, en el caso de *B. dothidea*, no se encontró supervivencia del micelio a partir de los 54°C. La identificación de esta especie puede

explicarse ya que al ser plantas que han permanecido un año en condiciones de cultivo y teniendo en cuenta que son hongos que se dispersan mediante esporas a través del viento, la lluvia y las heridas de poda, éstas pueden haberse infectado después de haber realizado el tratamiento en vivero. *Diplodia seriata* fue encontrada sólo en el tratamiento de 50°C durante 30 minutos tanto en injerto como en patrón, contrastando con experiencias como la de Luque *et al.* (2014), en la que bastó con un tratamiento con agua caliente entre 50 y 51°C para eliminarlo. Este resultado puede explicarse como en el caso anterior debido probablemente a una infección posterior de las plantas durante el año de permanencia en el campo, ya que esta especie también se dispersa mediante esporas aéreas. *Neofusicoccum parvum* se observó sólo en las plantas control, pero se trata de la especie que se encontró en el mayor número de plantas y que presentó un mayor porcentaje de infección, concretamente se identificó en 12 plantas y con un 14,3% de infección. Para este patógeno se observó que, aunque las plantas hayan estado en campo un año de cultivo, el control de esta especie ha sido efectivo. Además, en otros trabajos se ha observado que se trata de una especie bastante sensible a los tratamientos de termoterapia con una temperatura a partir de 50°C (Elena *et al.*, 2015; Luque *et al.*, 2014 y Billones-Baaijens *et al.*, 2014).

Por último, en el caso del Pie negro de la vid, en nuestro trabajo se identificaron las especies *D. alcacerensis* y *D. torresensis*, dos hongos que pertenecen a un complejo de hongos que recibe el nombre de *Dactylonectria macrodidyma complex*. En el caso de *D. alcacerensis*, se observó que los tratamientos de termoterapia no se mostraron muy eficaces tras la campaña de cultivo, quizás porque las plantas se reinfectaran en campo, aunque el porcentaje de infección era muy bajo (0,3%). Mientras que en el caso de *D. torresensis* se consiguió eliminar su presencia con los dos tratamientos, mostrando una menor resistencia a los mismos. En un estudio realizado por Gramaje *et al.* (2010) se demostró que *D. macrodidyma* es una especie muy sensible a los tratamientos de termoterapia con agua caliente, ya que con un tratamiento a 49°C pierde su viabilidad. Este dato confirmaría que la ha ocurrido durante la campaña de cultivo. El hecho de que estos hongos se hayan detectado puede deberse a que, al tratarse de hongos que se caracterizan por habitar el suelo (Agustí-Brisach y Armengol, 2013), éstos hayan infectado la planta a través de heridas en las raíces o en la base del patrón que está en contacto en el suelo.

Con los resultados obtenidos y con una observación de la micoflora global en las plantas quizás no se pueda afirmar que el tratamiento de termoterapia produce una reducción de los hongos patógenos de la vid después de la aplicación de tratamientos por termoterapia con agua caliente y un ciclo de cultivo en campo. Pero, cuando se estudian sólo los hongos que provocan las enfermedades de la madera en vid sí que se observa una reducción sustancial (incluso habiendo el caso de alguna especie concreta que aumente en campo). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que al utilizar una técnica que ayuda a combatir los hongos en vivero, una vez en campo las plantas son progresivamente colonizadas tanto por hongos de la madera ya presentes en el ambiente como por otros hongos del suelo y/o de la parte aérea.

Con el objetivo de comprender mejor lo explicado anteriormente, a continuación se presenta una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados obtenidos en el trabajo en el que se analizó esta misma partida de plantas inmediatamente después del tratamiento por termoterapia con agua caliente.

## ***5.2. Diferencias entre las especies presentes en la micoflora de plantas de vid injertadas analizadas inmediatamente tras el tratamiento y plantas que han permanecido una campaña de cultivo***

A continuación se comparan los datos obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Jesús Alfonso Crespo en el Trabajo Final de Master titulado “Efecto de los tratamientos por termoterapia con agua caliente sobre la micoflora presente en plantas de vid injertadas”, presentado en el año 2015, en el que se realiza un análisis de la micoflora presente en plantones de vid inmediatamente tras los tratamientos en el vivero y antes de que las plantas se llevaran a campo.

En el caso del porcentaje total de aislados fúngicos, los resultados fueron muy diferentes. Inmediatamente después del tratamiento se observó que la cantidad total de hongos aislados en las plantas tratadas con agua caliente fue mucho menor que en las plantas que no se sometieron a ningún tratamiento debido al efecto de la temperatura (Alfonso, 2015). Mientras que en el caso de las plantas que estuvieron una campaña en el campo, no se observan estas diferencias. Evidentemente, tras un ciclo de cultivo en campo cabe esperar que las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas se reduzcan,

pues las plantas han estado expuestas a los distintos hongos que se encuentran en el campo tanto en el suelo como a los de dispersión aérea. Esto no quiere decir que los tratamientos hayan sido inefectivos. A continuación se muestra un análisis de lo que ha ocurrido concretamente con los hongos de la madera de la vid (los que más preocupan en la actualidad por los daños que causan en el viñedo).

En el caso de los hongos causantes de la enfermedad de Petri (*C. luteo-olivacea*, *Pm. minimum* y *Pa. chlamydospora*), se observa que las dos primeras especies fueron detectadas tanto en plantas tratadas como en no tratadas en los dos momentos de análisis, debido a su resistencia a los mismos descrita en bibliografía (Gramaje *et al.*, 2010, Gramaje *et al.*, 2008), mientras que en el caso de *Pa. chlamydospora*, sólo se observó en las plantas control, evidenciando un buen control de esta especie.

En el caso de los hongos causantes del decaimiento por *Botryosphaeria*, (*B. dothidea*, *D. seriata* y *N. parvum*), *B. dothidea* tan sólo fue encontrada en este trabajo y como se ha indicado anteriormente fue sólo en el tratamiento de 53°C y 30 minutos de duración. *Diplodia seriata* fue detectada en ambos trabajos y en los dos se encontró en plantas tratadas, en el trabajo de Alfonso (2015) se encontró tanto en plantas control como en el tratamiento a 53°C pero la reducción de la presencia de esta especie era evidente, con un porcentaje de infección casi nulo en el caso de las plantas tratadas. En nuestro caso, *D. seriata* sólo se encontró en el tratamiento a 50°C, mientras que no se encontró en el tratamiento a 53°C. Esto es coherente con otras experiencias en las que se explica que un tratamiento de entre 50 y 51°C basta para eliminar este hongo (Luque *et al.*, 2014). *Neofusicoccum parvum* no fue detectado en las plantas tratadas en los dos trabajos, pero sí en las no tratadas, por lo que se deduce que este hongo no ha sido capaz de colonizar las plantas tras un año en el campo y que el tratamiento ha sido efectivo en su control.

Por último, en el caso de la enfermedad del Pie negro de la vid (*Dactylonectria macrodidyma complex*) en nuestro caso se observó que *D. alcacerensis* reaparece en el campo, aunque representando un porcentaje de infección muy bajo y que *D. torresensis* fue eliminada. En el caso del trabajo de Alfonso (2015) se observó que el tratamiento con agua caliente fue efectivo para el control de estas especies en correspondencia con lo que se indica en la bibliografía (Gramaje *et al.*, 2010). De esto se deduce que el tratamiento, en este grupo de patógenos, también ha sido efectivo.



### 5.3. Eficacia de los tratamientos tras un año de cultivo

Teniendo en cuenta los resultados globales (estudio realizado inmediatamente después de los tratamientos y estudio realizado después de un año de cultivo en campo), se puede afirmar que la micoflora total en las plantas tratadas se recupera progresivamente tras un año de cultivo en campo. Este aumento es debido probablemente a nuevas infecciones que ocurren en el campo y que, a priori, podrían hacer pensar que los tratamientos de termoterapia no han sido eficaces. Pero si se comparan los tres tratamientos a la salida del vivero y tras el año de cultivo se observa que:

-En el tratamiento control, tras un año de cultivo, ha habido un aumento considerable de los hongos de la madera pertenecientes a *Dactylonectria macrodidyma complex* y *N. parvum* mientras que en el caso de *Pa. chlamydospora* el aumento fue mínimo y los otros hongos de la madera se mantuvieron en niveles similares.

-En el tratamiento a 50°C y 30 minutos de duración, tras un año de cultivo, se observó una disminución de *C. luteo-olivacea* y *Pm. minimum*, ausencia de *N. parvum*, la aparición de *D. seriata*, de los hongos de la madera pertenecientes a *Dactylonectria macrodidyma complex* y de *Pa. chlamydospora* aunque a muy bajos niveles, que en el caso de las plantas analizadas inmediatamente tras el tratamiento no se detectaron (Alfonso, 2015).

-En el tratamiento a 53°C y 30 minutos de duración, tras un año de cultivo, se observan dos plantas infectadas por *B. dothidea* y por *Pa. chlamydospora* a muy bajos niveles y dos plantas infectadas por *Dactylonectria macrodidyma complex*. Se observa que la ausencia de *D. seriata* y de *N. parvum* se mantiene y que aumenta la presencia *Pm. minimum* y la de *C. luteo-olivacea*.

Por lo tanto, se puede suponer que el aumento de la micoflora fúngica general y de los niveles de infección por hongos de la madera en las plantas tras un ciclo de cultivo en campo, respecto las plantas analizadas inmediatamente después del tratamiento, es debido a que las plantas son colonizadas progresivamente tanto por hongos saprofitos como patógenos presentes en el campo. De ello se desprende que los tratamientos realizados con agua caliente en los viveros sí son efectivos y pueden ser útiles para los agricultores. Ahora bien, con el tiempo es lógico que las infecciones en campo y el

crecimiento fúngico en las plantas vaya aumentando, por lo que se ha de seguir insistiendo a los agricultores en la necesidad de realizar todas aquellas operaciones que vayan dirigidas a mantener el mejor estado fitosanitario de las plantas que hayan sido tratadas en vivero. Para ello, deberían utilizarse inmediatamente tras la plantación estrategias como la aplicación de fungicidas o agentes de biocontrol en plantación y en las podas posteriores, así como utilizar todas las técnicas de gestión integrada disponibles. Además, también habrá que seguir investigando para desarrollar nuevas técnicas que mejoren el estado fitosanitario de los plántones así como abaratar los costes de las mismas para hacerlas más accesibles a los productores.

## 5. Conclusiones

-Tras un año de cultivo en campo, y en comparación con la situación que presentaban las plantas injertadas inmediatamente después del tratamiento por termoterapia antes de su plantación en campo, la micoflora total presente en plantas de vid injertadas tratadas con por termoterapia con agua caliente a 50 °C 30 minutos o a 53 °C 30 minutos no presenta grandes diferencias entre los dos tratamientos, ni con las plantas control no tratadas, probablemente debido a una colonización progresiva de las plantas tratadas, a través de las raíces y de la parte aérea.

-Respecto a los patógenos de la madera, también en comparación con la situación que presentaban las plantas injertadas inmediatamente después del tratamiento por termoterapia antes de su plantación en campo, en el tratamiento a 50°C se observaron infecciones por *D. seriata*, *Dactylonectria macrodidyma complex* y *Pa. chlamydospora* aunque a bajos niveles. En el caso del tratamiento a 53°C se observó un aumento de *Pm. minimum* y *C. luteo-olivacea* y una infección a bajos niveles de *B. dothidea* y de *Pa. chlamydospora*.

-En las plantas tratadas, se observó que globalmente se ha producido una disminución del conjunto de los hongos patógenos de la madera detectados, del número de plantas infectadas y del porcentaje de infección, aún después de un año del tratamiento, demostrando que los tratamientos por termoterapia con agua caliente resultan eficaces para su control. Además, el hecho de que haya habido reinfecciones en campo y un ligero aumento de los hongos que no pudieron ser controlados con el tratamiento, también demuestra que en el viñedo es necesario actuar para mantener el correcto estado fitosanitario de las plantas injertadas después de la plantación.

## 6. Bibliografía

**Agustí-Brisach C. y Armengol J. (2013).** Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, 52: 245-261.

**Agustí-Brisach C., García-Jiménez J., Armengol J. y Gramage D. (2014).** Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control. *Phytoma España*, 260: 26-30.

**Agustí-Brisach C., Gramage D., Armengol J. y García-Jiménez J. (2013).** Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. *Tierras*, 202: 108-113.

**Alfonso J. (2015).** Efecto de los tratamientos por termoterapia con agua caliente sobre la micoflora presente en plantas de vid injertas. Trabajo Fin de Master en Sanidad y Producción Vegetal. UPV.

**Berstch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C. y Fontaine F. (2012).** Grapevine trunk disease: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62: 243-265.

**Billones-Baaijens R., Allard A., Hong Y., Jones E.E., Ridgway H.J. y Jaspers M. V. (2015).** Management of *Botryosphaeria* species infection in grapevine propagation

material. Program and abstracts 9th International Workshop on Grape vine Trunk Diseases, Adelaide, Australia: 55.

**Cabral A., Rego C., Nascimento T., Oliveira H., Groenewald J. Z., y Crous P. W. (2012).** Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal biology*, 116: 62-80.

**Elena G., Di Bella V., Armengol J., y Luque J. (2015).** Viability of Botryosphaeriaceae species pathogenic to grapevine after hot water treatment. *Phytopathologia Mediterranea* 54, 2: 325-334.

**FAO. (2016).** FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible a través de <http://faostat.fao.org> (acceso: 21 de Marzo de 2016).

**Gardes M. y Bruns T. D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.

**García-Jiménez, J. (2004).** Enfermedades fúngicas de madera. Pgs. 221-228 en: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 5ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

**Gramaje D., Alaniz S., Abad-Campos P., García-Jiménez J. y Armengol J. (2010).** Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology*, 156: 231-241.

**Gramaje, D. y Armengol, J. (2011).** Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95: 1040-1055.

**Gramaje D., Armengol J., Salazar D., López-Cortés I., y García-Jiménez J. (2009).** Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection*, 28: 280-285.

**Gramaje D., García-Jiménez J y Armengol J. (2008).** Sensivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. *Annals of Applied Biology*, 153: 95-103.

**Hallen F., Fourie P.H., y Lombard P.J. (2010).** Protection of Grapevine Pruning Wounds against *Eutypa lata* by Biological and Chemical Methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31: 125-132.

**Hidalgo, L. (2002).** *Tratado de Viticultura General*. 3ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

**Lombard, L., Van Der Merwe N.A., Groenewald J. Z. y Crous P. W. (2014).** Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 3: 515-532.

**Luque J., Georgina E., Armengol J.y Legorburu J. (2014).** Las enfermedades de la madera de la vid: refleiones sobre un panorama complejo. Phytoma España, 260: 18-24.

**MAGRAMA. (2014a).** Anuario de estadística del Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Disponible a través de: [http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2014/AE\\_2014\\_Completo.pdf](http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2014/AE_2014_Completo.pdf) (acceso: 20 de Abril de 2016).

**MAGRAMA. (2014b).** Guía de gestión integrada de plagas. Uva de transformación. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible a través de: [http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAUVADETRANSFORMACION\\_tcm7-332679.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAUVADETRANSFORMACION_tcm7-332679.pdf) (acceso: 21 de Marzo de 2016).

**OIV. (2015).** Elementos de la coyuntura vitivinícola Mundial. Comunicado de prensa del 28 de octubre de 2015, París. Organización internacional de la viña y el vino.

**Reyner A. (2002).** Manual de viticultura. Guía técnica de viticultura. 6ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

**Sorolla, A., Cambra, M. y Gramaje, D. (2016).** Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Informaciones técnicas 1/2016. Centro de Sanidad y Certificación Vegetal. Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario. Gobierno de Aragón.

**Waite H., y Morton L. (2007).** Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 5–17