

# Efectos de tres fungicidas sobre 11 especies de hongos asociados al decaimiento de la vid

N. López, H. Muñoz, L. Martín, M.T. Martín (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Zamadueñas, Valladolid, España).

En este trabajo se presentan los efectos de carbendazima (Eurozim-50), flusilazol (Nustar®) y carbendazima-flusilazol (Escudo®), sobre 11 especies de hongos asociados al decaimiento de la vid. Los experimentos se realizaron en placas Petri en medio de cultivo agar-extracto de malta (MEA) y se puso a punto un método de estudio sobre secciones de sarmientos. En placas con MEA y en presencia de carbendazima el crecimiento de todos los aislados se redujo significativamente. En presencia de flusilazol *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *Phaeoacremonium aleophilum* crecieron en más de un 50%. La suma de las dos materias activas presentes en Escudo® resultó en una mayor o menor inhibición para todos los aislados estudiados. En los ensayos sobre secciones de sarmientos en ausencia de fungicidas se observó la propagación de *D. seriata*, *Diplodia mutila*, *B. dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Neofusicoccum parvum*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* y *Eutypa lata* a lo largo del tejido leñoso en el 75% o más de los sarmientos. Se confirma el mayor efecto inhibitor de carbendazima que de flusilazol así como el mayor efecto inhibitor de Escudo®. Estos datos validan ambos ensayos para el estudio de distintos productos sobre los hongos asociados al decaimiento de la vid.

## INTRODUCCIÓN

El decaimiento de la vid es un nombre genérico que agrupa varias enfermedades o sintomatologías, y que está asociado a un conjunto de hongos fitopatógenos. En plantas adultas las principales enfermedades son la yesca, la eutipiosis y el brazo negro muerto, en plantaciones jóvenes se ha descrito la enfermedad de Petri y el pie negro. El decaimiento de la vid es un problema creciente en todo el mundo, incluidas las distintas zonas vitivinícolas de España (ARMENGOL y col. 2001, MARTÍN y COBOS, 2007). Los síntomas foliares no aparecen todos los años y su expresión parece depender de factores externos. Por lo cuál plantas aparentemente sanas sirven como *reservoir* de patógenos que se transmiten de una planta a otra. La mayoría de estos hongos producen esporas que son transportadas por el agua y el viento hasta heridas de otras plantas susceptibles. El decaimiento de la vid también se transmite a través de la manipulación que implican los procesos de multiplicación de plantas en viveros (FOURIE y HALLEEN, 2004). Los hongos asociados a estas enfermedades se desarrollan preferentemente en o entorno al floema y al xilema, obstruyen los vasos, impiden la circulación de la savia (PASCOE, 2000) y provocan la pudrición de la madera. Además de estos daños especies como *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y algunas *Botryosphaeriaceae* spp. son capaces de producir fitotoxinas (ANDOLFI y col., 2011). Por todo ello el daño que causan conduce a una mayor o menor reducción en la producción anual de uva y en su calidad. Pero es importante señalar que a diferencia de enfermedades fúngicas foliares como el oidio, el mildiu y la botritis que causan pérdidas de una campaña, estas enfermedades dañan la madera progresivamente hasta causar la muerte de la planta. Hay más de treinta de especies de hongos asociados al decaimiento de la vid, algunas como *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *Diplodia seriata* han sido descritas en todas las zonas vitivinícolas mundiales. Otras parecen estar más circunscritas a determinadas zonas o continentes. Las especies más frecuentes en España además de las tres citadas anteriormente son *Neofusicoccum parvum*, *Cylindrocarpon macrodidymum*, *C. liriiodendri* y *Eutypa lata*.

Además de tener un problema en la expresión de los síntomas foliares, el elevado número de especies asociadas a estas enfermedades, hay problemas en los tratamientos su penetración e interacción con los hongos endófitos (fitopatógenos o no). Los fungicidas químicos inhiben la reproducción de los hongos impidiendo la germinación de sus esporas y el crecimiento de su micelio. Jaspers (2001) estudio *in vitro*

el efecto de 22 fungicidas sobre tres aislados de *P. chlamydospora*. La mayoría de ellos redujo más la germinación de las esporas que el crecimiento del micelio. También *in vitro* Rego y col., (2006) compararon 14 fungicidas sobre cuatro aislados de *Cylindrocarpon destructans*. Estos fungicidas produjeron mayor inhibición sobre el crecimiento del micelio que sobre la germinación de las esporas. Laukart y col. (2001) investigaron los efectos de ocho fungicidas en plantas con síntomas de la enfermedad de Petri, de los ocho, el fosfonato fue el que más redujo los síntomas de la enfermedad. En Italia, Calzarano y col. (2004) inyectaron triazoles y/o Al fosetil en los troncos de vides con síntomas de yesca, o en el suelo que las rodeaban. Después de siete años de seguimiento, concluyeron que las inyecciones en el tronco proporcionaron una mejor protección que las aplicaciones al suelo. Darrieutort y Lecomte, 2007 probaron las inyecciones al tronco de derivados de triazol y otros compuestos, la conclusión fue que el efecto no es significativo ni duradero sobre la remisión de eutipiosis o de yesca. La mayoría de los trabajos realizados estudian varios productos sobre un número reducido de especies de hongos asociados al decaimiento de la vid. Este trabajo presenta la eficacia *in vitro* y en secciones de sarmiento de un protector de heridas de poda (Escudo®) sobre 11 especies de hongos asociados al decaimientos de la vid. En paralelo se realizó el estudio por separado de las dos materias activas de Escudo® que son carbendazima y flusilazol.

## Materiales y métodos

**Aislados fúngicos estudiados:** Se utilizaron dos aislados por cada una de las 11 especies estudiadas (Tabla 1). Se compraron seis aislados CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda) *D. seriata*, *D. mutila*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. El aislado *E. lata* ST 309 fue cedido por J.P. Péros (INRA, Francia). Los demás aislados proceden de nuestra colección.

**Fungicidas:** Escudo® (DuPont, productos agrícolas, Barcelona), es un fungicida que resulta de la combinación de flusilazol (5 g/l) y carbendazima (10 g/l). En paralelo se realizaron ensayos con carbendazima (Eurozim-50; Probelte, Madrid) utilizando una solución 10 g/l, y ensayos con flusilazol (Nustar® 40EX, DuPont Ibérica Barcelona) utilizado en solución a 5 g/l.

**Medios de cultivo:** Los medios de cultivo utilizados fueron Agar-extracto de malta (MEA) y agar patata-dextrosa (PDA) proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania). A los que se añadió cloranfenicol a 0,25 g/l (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

**Ensayos en placa Petri:** Escudo® es un producto denso y fue necesario diluirlo al 50% para su uso en los ensayos *in vitro*. Tampoco fue fácil su uso dentro del medio de cultivo por lo que fue necesario usarlo extendiéndolo por encima del medio de cultivo como si se tratase de una herida de poda. En los ensayos, de carbendazima y de flusilazol estos fungicidas se usaron a las concentración que se encuentran en el formulado Escudo®, es decir 10 g/l y 5 g/l de glicerol al 50%, respectivamente. Las placas MEA fueron divididas en dos secciones, una de 1/3 y la otra de 2/3 de su área. Los fungicidas (150 µl) se extendieron sobre 1/3 de la placa. Se dejaron penetrar unas horas y después se depositó en el centro de cada zona un trozo de

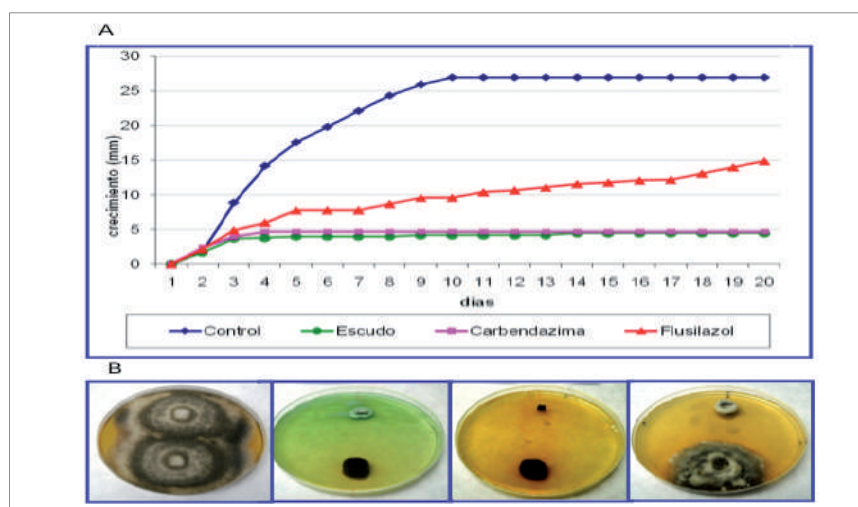


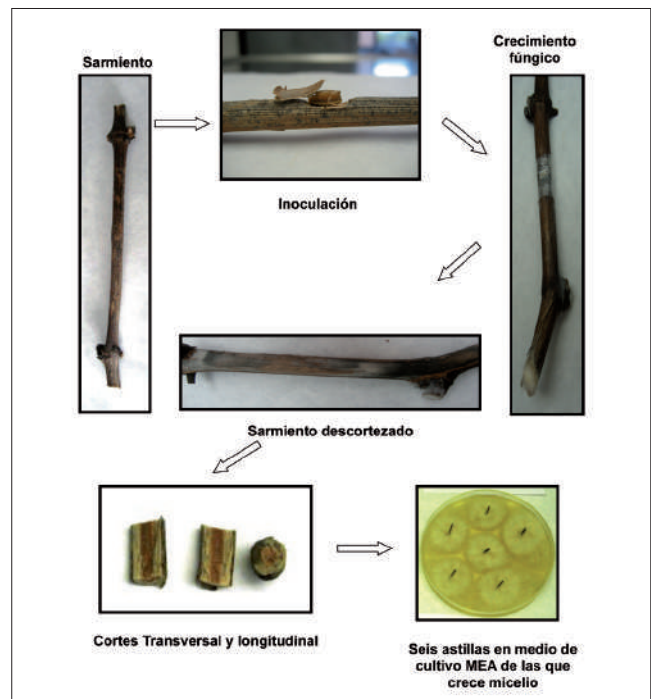
Figura 1. A) Gráfico del crecimiento de *Diplodia seriata* en ausencia de fungicida (control), en presencia de Escudo®, carbendazima o flusilazol. B) Fotos de placas MEA en ausencia de fungicida, en presencia de Escudo®, carbendazima o flusilazol (de izquierda a derecha) del crecimiento de *D. seriata* a los 20 días a 25 °C.

agar con micelio del aislado correspondiente. De esta manera en una misma placa se pudo valorar el efecto directo del fungicida sobre el micelio (1/3 de la placa) y el efecto de la difusión del fungicida, a unos centímetros, de distancia (2/3 de la placa) que sirvió como control. Para calcular el efecto del fungicida sobre el crecimiento de los hongos se tuvo en cuenta el diámetro medio de crecimiento en contacto directo tomado a los 10 días para las especies de Botryosphaeriaceae, 30 días para las especies del género *Cylindrocarpon* y *E. lata* y 40 días para *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. Cada aislado se sembró en dos placas por fungicida; como control de crecimiento se sembraron dos placas sin fungicida. Se realizaron dos repeticiones de cada ensayo. Con carbendazima y flusilazol se realizaron también ensayos en placa añadiendo la solución fungicida en el medio de cultivo atemperado y se repartió en las placas Petri que se sembraron

una vez solidificado el medio. Todas las placas se mantuvieron a 25°C en la oscuridad. El crecimiento radial del micelio (mm) se midió en dos direcciones perpendiculares con regularidad cada 1-2 días para las especies de Botryosphaeriaceae, cada 3 días para las especies de *Cylindrocarpon* y *E. lata* y cada 6 días para las especies de crecimiento lento *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. En los casos en los que no hubo crecimiento ni en contacto directo, ni a distancia se transfirieron los inóculos a medio PDA sin fungicidas, con el fin de determinar si la actividad del fungicida tiene efecto fungistático o fungicida. Las placas se incubaron como anteriormente 25°C, oscuridad durante 30 o 40 días. En ausencia de crecimiento se consideró que el efecto fue fungicida, por el contrario cuando el micelio creció, el efecto se consideró fungistático, tras la comprobación del crecimiento positivo en ausencia de fungicida.

Especie	Nombre aislado	Lugar de procedencia
<i>Diplodia seriata</i>	CBS 719.85 Y207-1-1c	Nueva Zelanda Tierra Vino Zamora
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 431.82 Y63-1-1a	Holanda Arribes Duero
<i>Boryosphaeria dothidea</i>	CBS 110302 Y107-9-1	Portugal Extremadura
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS 110301 Y102-7-1c	Portugal Extremadura
<i>Dothiorella iberica</i>	Y81-1-2 TP46-5-3	Ribera de Duero Valladolid
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS 631.94 Y82-2-5	Italia Morales. Toro
<i>Phaeomonilia chlamydospora</i>	CBS 239.74 Y38-8-1	California, Estados Unidos Valle Benavente
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>	Y111-7-2a Y160-59-1c	Arribes de Duero La Mancha
<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>	Y242-1-2a Y134-4-1ii	Rueda Vivero
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	S20-2-2a S21-4-1a	Salamanca Salamanca
<i>Eutypa lata</i>	ST 309 Y249-4-1b	Francia Tierra Vino Zamora

**Tabla 1. Nombres de especies y aislados fúngicos y su procedencia estudiados es este trabajo.**



**Figura 2. Procedimiento de inoculación y análisis de las secciones de sarmiento de vid. Sección de unos 15-20 cm con dos nudos, herida sobre la que se extendió el fungicida, se colocó el micelio y se selló. Tras la incubación se descortezó, se realizaron cortes transversales y longitudinales y se pusieron 6 astillas en placas de cultivo MEA, de las que crecieron los micelios del hongo inoculado.**

**Secciones de sarmiento:** Se utilizaron sarmientos de variedad Tempranillo. Los sarmientos se cortaron en secciones de 15-20 cm, dejando dos nudos por sección. Se lavaron y secaron bajo luz ultravioleta.

**Ensayos sobre sarmiento:** En el ensayo con las secciones de sarmiento, se realizó un corte fresco sobre el que se aplicó 50 µl de fungicida o agua esteril y posteriormente se inóculo con cada aislado o solo con agar (Figura 2). La herida se cubrió con Parafilm®. Para cada ensayo se incluyeron diez réplicas. Se dejaron los sarmientos a 22°C durante uno a tres meses. Se cortaron los sarmientos 1 cm por encima de la inoculación y se colocaron seis astillas de cada corte en placas MEA. Se incubaron a 25 °C hasta que los hongos crecieron y se identificaron morfológica o molecularmente (MARTIN y COBOS, 2007).

**Análisis estadístico:** Los resultados de los ensayos se sometieron a un análisis de la variancia ANOVA y se compararon los tratamientos mediante una prueba de T-Bonferroni (Dunn) con un nivel significativo del 5%.

## Resultados

### Ensayos en placa Petri

En los ensayos en placa Petri se midió el crecimiento del micelio de los distintos aislados en ausencia y en presencia de las dos materias activas (flusilazol y carbendazima) y su combinación (Escudo®). En la Figura 1 se muestran las curvas obtenidas con las medias de los crecimientos en ausencia y presencia de fungicidas, para el aislado *D. seriata* CBS719.85. El crecimiento en contacto directo fue menor que el crecimiento a distancia, observándose un gradiente de difusión de la materia activa que provoca un mayor desarrollo del hongo en la parte más distal de la zona de aplicación. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos con todas las combinaciones ensayadas. En todos los casos el crecimiento obtenido en las placas de control en ausencia de fungicida, se consideró como el crecimiento 100%, y sirvió para calcular el crecimiento en presencia de las distintas materias activas.

Carbendazima inhibió completamente el crecimiento de *P. chlamydospora*, de las tres especies de *Cylindrocarpon* ensayadas y redujo significati-

vamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de los demás especies ensayadas. Flusilazol impidió el crecimiento de *E. lata* y *P. chlamydospora*; redujo el crecimiento de *D. mutila*, *N. parvum*, *C. pauciseptatum* en más del 75%. Sin embargo, permitió el crecimiento entre 42-55% de *D. seriata*, *B. dothidea*, *Dothiorella iberica*, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* y de *P. aleophilum* en un 74%. Escudo® causó una inhibición completa del crecimiento de *E. lata*, *P. chlamydospora*, y las tres especies de *Cylindrocarpon*. La inhibición del crecimiento de las demás aislados fue mayor con la combinación de las dos materias activas que con cada una de ellas por separado.

Carbendazima actuó como fungistático sobre *P. chlamydospora*. Flusilazol sólo actuó como fungicida sobre *E. lata* y tuvo un efecto fungistático sobre *P. chlamydospora*. Escudo® actuó como fungistático sobre *P. chlamydospora* sin embargo su efecto fue fungicida sobre *E. lata* confirmando los resultados obtenidos con las materias activas utilizadas individualmente.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con las materias activas carbendazima y flusilazol, añadidas al medio de cultivo a temperatura fueron iguales a los obtenidos en la 1/3 parte de

Especie	Control	Carbendazim	Flusilazol	Escudo®
<i>Diplodia seriata</i>	27,1 ± 0,4 (100%)a	4,8 ± 0,8 (17%)b	15,2 ± 2,5 (55%)b	4,7 ± 0,9 (17%)b
<i>Diplodia mutila</i>	24,8 ± 1,6 (100%)a	2,6 ± 0,5 (11%)b	5,1 ± 2,3 (21%)b	1,2 ± 0,8 (5%)b
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	25,9 ± 0,4 (100%)a	4,5 ± 0,6 (17%)b	14,2 ± 0,6 (52%)b	3,8 ± 0,5 (15%)b
<i>Neofusicoccum parvum</i>	27,2 ± 0,9 (100%)a	4,4 ± 0,7 (17%)b	6,6 ± 0,8 (24%)b	3,5 ± 0,6 (13%)b
<i>Dothiorella iberica</i>	27,2 ± 1 (100%)a	1,3 ± 0,4 (4%)b	11,4 ± 0,5 (42%)b	0,7 ± 0,2 (2%)b
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	14,6 ± 0,5 (100%)a	1,3 ± 0,4 (6%)b	11,2 ± 0,7 (74%)a	0,4 ± 0,3 (2%)b
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	12,2 ± 0,9 (100%)a	0,0 ± 0 (0%)b	0,0 ± 0 (0%)b	0,0 ± 0 (0%)b
<i>Cylindrocarpum liriodendri</i>	25,5 ± 0,8 (100%)a	0,0 ± 0 (0%)b	12,7 ± 1 (50%)b	0,0 ± 0 (0%)b
<i>Cylindrocarpum macrodidymum</i>	24,3 ± 0,5 (100%)a	0,0 ± 0 (0%)b	11,8 ± 0,7 (49%)b	0,0 ± 0 (0%)b
<i>Cylindrocarpum pauciseptatum</i>	24,8 ± 0,8 (100%)a	0,0 ± 0 (0%)b	2,1 ± 0,6 (9%)b	0,0 ± 0 (0%)b
<i>Entyria lata</i>	22 ± 0,4 (100%)a	1,3 ± 1,5 (6%)b	0,0 ± 0 (0%)b	0,0 ± 0 (0%)b

**Tabla 2. Crecimiento medio del micelio, su desviación estándar y el porcentaje de crecimiento en comparación con el control (100%) de cada especie en presencia de Escudo®, carbendazima y flusilazol en las placas MEA. La letra minúscula (a o b) indican si los valores obtenidos son significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ).**

especie	Control	Carbendazim	Flusilazol	Escudo®
<i>Diplodia seriata</i>	89,2±6,7 a	28,3±10 b	45,8±10 b	15±8,3 b
<i>Diplodia mutila</i>	80,8±8,3 a	4,2±4,2 c	34,2±10 b	9,2±6,7 bc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	95,8±2 a	15,8±7,5 c	51,7±10 b	9,2±5 c
<i>Neofusicoccum parvum</i>	87,5±5 a	13,3±6,7 bc	34,2±10 b	0,0±0 c
<i>Dothiorella iberica</i>	97,5±1,7 a	24,2±10 b	30,0±10 b	9,2±6,7 b
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	33,3±8,3 a	8,3±5 a	26,7±10 a	7,5±3 a
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	25,0±8,3 a	0,0±0 b	0,0±0 b	0,0±0 b
<i>Cylindrocarpum liriodendri</i>	40,8±10 a	23,3±6,7 ab	50,0±10 a	0,0±0 c
<i>Cylindrocarpum macrodidymum</i>	40,8±10,6 a	4,2±4,2 b	31,7±8,3 a	0,0±0 b
<i>Cylindrocarpum pauciseptatum</i>	51,7±8,3 a	5,8±3,3 b	37,5±10 a	0,0±0 b
<i>Entyria lata</i>	72,5±8,3 a	4,2±4,2 b	25,0±8,3 b	5,0±3,3 b

**Tabla 3. Crecimiento en sarmiento de las distintas especies de hongos estudiadas frente a las dos materias activas y su mezcla. El porcentaje de crecimiento se calculo sumando el número de astillas de las que creció el hongo inoculado con respecto al total de astillas por especie. La letra minúscula (a o b) indica si los valores obtenidos son significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ).**

la placas en las que el fungicida esta en contacto directo con el micelio de los aislados ensayados en este estudio.

### Ensayos en sarmientos

Los resultados obtenidos sobre el ensayo en sarmientos se recogen en la (Tabla 3). En algunos casos después de la inoculación se observó micelio fúngico en los extremos del sarmiento y el interior de la madera después de retirar la corteza (ver detalle en Figura 2). Los cortes transversales y longitudinales mostraron las típicas zonas oscuras y vasos obstruidos. Del 75 al 100% de las secciones de sarmiento inoculados con *D. seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea*, *N. parvum*, *Do. iberica*, *C. pauciseptatum* y *E. lata* se re-aisló el hongo inoculado en las condiciones de control (sin fungicida). Sin embargo en las mismas condiciones *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* solo crecieron en aproximadamente la mitad de los sarmientos. Se comparo el valor obtenido en presencia de cada fungicida en función de los 20 sarmientos inoculados inicialmente por especie de hongo contando para cada uno de los sarmientos el número de astillas de las

que creció el hongo inoculado (0-6) que se expreso en porcentaje. Carbendazim permitió el crecimiento de *C. liriodendri* al 23,3% redujo por completo el desarrollo de *P. chlamydospora* y dejó el crecimiento de las demás especies entre un 4,2% a un 28,3%. Flusilazol estimuló el desarrollo de *C. liriodendri*, permitió el crecimiento de *P. aleophilum*, *C. macrodidymum* y *C. pauciseptatum* a niveles similares al control sin fungicida. Sin embargo flusilazol inhibió por completo el crecimiento de *P. chlamydospora*. En general este compuesto permitió el crecimiento de las distintas especies en porcentajes superiores a los observados en presencia de carbendazim. En presencia de Escudo® se observó un efecto sinérgico entre carbendazim y flusilazol que dio como resultado la ausencia de desarrollo de *N. parvum*, *P. chlamydospora*, *C. liriodendri*, y *C. macrodidymum*. Escudo® en ningún caso permitió el crecimiento en más del 15% de las astillas analizadas procedentes de los sarmientos inoculados.

### Discusión

Escudo®, carbendazima y flusilazol tuvieron efecto inhibitorio en el desarrollo de los micelios *D.*

*seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea*, *N. parvum*, *Do. iberica*, *C. pauciseptatum* y *E. lata* que crecieron al menos en el 75% de los sarmientos en ausencia de fungicida. Flusilazol fue la materia activa de menor efecto inhibitorio. Los datos obtenidos *in vitro* y en sarmientos están correlacionados. *P. chlamydospora*, *P. aleophilum*, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* solo crecieron en el 25,0-40,8% de los sarmientos control por lo que los resultados en presencia de Escudo®, carbendazima o flusilazol son menos representativos. Aun así también existe cierta correlación entre los dos ensayos y se confirma que flusilazol tiene menos efecto inhibitorio que carbendazima. Esto permitiría concluir que Escudo® tienen un cierto efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las especies estudiadas. Los dos métodos utilizados dan resultados concordantes, son fáciles de manejar y pueden aplicarse a estudios comparativos de sustancias químicas para el control de patógenos. También puede ser un complemento en ensayos de comparación de virulencia entre diferentes cepas de una misma especie patógena o en ensayos de sensibilidad o tolerancia de cultivares a distintos patógenos, antes o en paralelo a los arduos e indispensables

ensayos en campo que autores como Calzarano y col., 2004, Rolshausen y Gubler, 2005, Darrieutort y Lecomte 2007 han realizado.

En los estudios en medio de cultivo MEA, la mayoría de los aislados fueron más sensibles a carbendazima que a flusilazol. En presencia de Escudo®, el crecimiento de todas las cepas se redujo aun más que con cualquiera de las dos compuestos químicos por separado revelando efecto sinérgico. La eficacia y el efecto sinérgico entre la carbendazima y flusilazol fueron también descritos sobre *C. destructans* por (REGO y col., 2006). En algunos casos el efecto de las materias activas fue fungistático. Sugiriendo que *P. chlamydospora* por ejemplo podría ser de nuevo activo después de 6-8 semanas que permanecen activos los productos químicos estudiados. Otra limitación de estos compuestos es la existencia de un gradiente corto (20-30mm en una placa MEA) en la eficacia inhibitoria sobre la mayor parte de las cepas estudiadas. Actualmente en España ya no esta autorizado el uso de Escudo®,

que se promocionó como fungicida para extender sobre las heridas de poda.

Pese a todo el desarrollo de estrategias de control contra las enfermedades de decaimiento de la vid no ha hecho más que empezar. Los esfuerzos centrados en el control de plantas jóvenes (enfermedad de Petri y pie negro) a nivel de investigación ha aportado mejoras (FOURIE y HALLEEN, 2004, GRAMAJE y col., 2009) que podrán integrar los viveristas en los procesos de multiplicación para producir planta más sana en cuanto a estas enfermedades. Estos métodos integran distintos tratamientos tal como el cloruro de didecildimetilamonio, benomilo, ácido fófórico, diferentes formulados de *Trichoderma* spp. y bacterias, o agua caliente (30 min a 50 °C) en los pasos de hidratación de los esquejes. También se propone sumergir el material de siembra en carbendazima. Estos tratamientos reducen la infección por *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. También se ha demostrado que *P. chlamydospora* esta muy relacionado con los fallos de predimien-

to de injertos, por lo que saber que cualquiera de las materias activas utilizadas en este estudio y en otros, puede favorecer este punto en la línea de producción de plantas.

El oscurecimiento del floema tras la inoculación e incubación de las especies de Botryosphaeriaceae indicaría una de sus formas iniciales de propagación. También se ha observado oscurecimiento en el xilema en las inoculaciones con *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* que confirman los resultados publicados por Sparapano y col. (2000). Sería interesante realizar un seguimiento más concreto sobre este aspecto y ver como evolucionan las sintomatología y las interacciones planta/patógeno con este sencillos métodos.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen al Drs. J. Yuste por facilitar los sarmientos. Este trabajo fue financiado por el Plan de Experimentación Agraria, la SA. ISAGRO, y los fondos FEDER.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDOLFI A., MUGNAI L., LUQUE J., SURICO G., CIMMINO A., EVIDENTE A., 2011. *Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases*. Toxins, 3, 1569-1605; doi:10.3390/toxins3121569
- ARMENGOL J., VICENT A., TORNÉ L., GARCÍA-FIGUERES F., GARCÍA-JIMÉNEZ J., 2001. *Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey*. Phytopathologia Mediterranea 40, 325-329.
- CALZARANO F., DI MARCO S., CESARI A., 2004. *Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis*. Phytopathologia mediterranea 43 (1), 116-124.
- DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F., CESARI A., 2000. *The control of esca: status and perspectives*. In: Phytopathologia mediterranea special issue: "Esca and grapevine declines" 39 (1), 232-240.
- DARRIEUTORT G., LECOMTE P., 2007. *Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases*. Phytopathologia mediterranea 46, pp 50-57.
- FOURIE P.M., HALLEEN F., 2004. *Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material*. Plant disease 88 (1), 1241-1245.
- GRAMAJE D., AROCA Á., RAPOSO R., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ARMENGOL J., 2009. *Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process*. Crop Protection 28: 1091-1097.
- JASPERS M.V. 2001. *Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of Phaeoconiella Chlamydospora*. Phytopathologia mediterranea 40, S453-S458.
- LAUKART N., EDWARDS J., PASCOE I.G., KGUYEN N.K., 2001. *Curative treatments trialed on young grapevines infected with Phaeoconiella chlamydospora*. Phytopathologia mediterranea 40, S459-S463.
- MARTÍN M.T., COBOS R., 2007. *Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain)*. Phytopathologia mediterranea 46, 18-25.
- PASCOE I., COTTRAL E., 2000. *Developments in grapevine trunk diseases research in Australia*. Phytopathologia mediterranea 39, 68-75.
- REGO C., FARROPAS L., NASCIMENTO T., CABRAL A., OLIVEIRA H., 2006. *Black foot of grapevine: sensitivity of Cythindrocarpon destructans to fungicides*. Phytopathologia mediterranea 45, S93-S100.
- ROLSHAUSEN P.E., GUBLER W.D., 2005. *Use of boron for the control of eutypa dieback of grapevines*. Plant Disease 89 (7), 734-738.
- SPARAPANO L., BRUNO G., CICCARONE C., GRANITI A., 2000. *Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interaction among Phaeoacremonium chlamydosporum, P. aleophilum and Fomitiporia punctata*. Phytopathologia mediterranea 39, 53-58.