

Del 2 al 5 de mayo de 2023

CENTRO UNIVERSITARIO
SANTA ANA
ALMENDRALEJO



Joaquín Sorolla Bastida. Comiendo uvas, 1898. Acuñera sobre papel. Museo Sorolla, n° inv. 00427

XLV JORNADAS
DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO
DE EXTREMADURA

XLV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

Joaquín Sorolla Bastida. "Comiendo uvas". 1898. Acuarela sobre papel.
Museo Sorolla. n: inv. 00427. © Fundación Museo Sorolla

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: María Sabater

ISBN: 84-7930-113-9

D.L.: BA-000169-2024

Imprime: Impresal

Alternativas actuales al arsenito sódico como preventivos de enfermedades de madera de la vid

GUERA-NOGALES, J.J.¹

BUENO, M.²

GARCÍA-GARCÍA, B.¹

CARCABOSO, J.A.²

ECHAVE, A.C.³

MARTÍN, L.¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).
Área de Protección Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrarias
Finca La Orden-Valdesequera.

² Sociedad Cooperativa Montevirgen.

³ Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio.
Servicio de Sanidad Vegetal.

RESUMEN

La yesca y otras enfermedades de la madera de la vid (EMV) son actualmente una gran preocupación para el sector vitivinícola mundial porque causan la muerte prematura de cepas, limitando los años de producción. Los cortes de poda son vías de entrada para los hongos patógenos asociados a EMV. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de formulados comerciales del hongo *Trichoderma*, considerado un agente de control biológico (ACB), como tratamiento preventivo para evitar la infección a través de las heridas de poda. Se han ensayado tres formulados comerciales frente a un control negativo (no tratado) y un control positivo (metil-tiofanato). El ensayo se ha realizado en un viñedo de variedad Tempranillo cultivado en secano y conducido en vaso, en Villalba de los Barros (Badajoz). El año de plantación fue 2013. El ensayo se ha repetido durante tres campañas (2020, 2021 y 2022). Se han recogido muestras de madera a los 30 días, a los 90 días y a un año post tratamiento. Por cada tratamiento / año y momento de muestreo se analizaron 20 cepas. Se realizó un análisis microbiológico de la madera. Se cuantificaron el porcentaje medio de infección (PMI) por hongos causantes de EMV y el porcentaje de implantación de *Trichoderma spp.* El PMI fue significativamente mayor en el control negativo ($16,03 \pm 2,59$) que en los tratamientos ($< 4,5$). El porcentaje de implantación del ACB fue significativamente mayor en los tratamientos con *Trichoderma* (50-100%) que en los controles ($< 10,0\%$). No se encontraron diferencias significativas entre los tres formulados ensayados. El porcentaje medio de control de la enfermedad fue del 100% a los 30 y 90 días post tratamiento, y de entorno al 50% al año post-tratamiento. Este trabajo arroja nueva información sobre la eficacia de estos tratamientos en las condiciones de cultivo de Tierra de Barros.

Palabras clave: Yesca, poda, cepas, Tierra de Barros, agentes de biocontrol (ACB), *Trichoderma*

SUMMARY

Esca and other grapevine trunk diseases (GTDs) are currently a major concern for the global wine industry because they cause premature death of vines, limiting years of production. Pruning wounds are pathways for infection of pathogenic fungi associated with GTDs. The objective of this work is to evaluate the effect of the application of commercial formulations of the

Trichoderma fungus, considered a biological control agent (BCA), as a preventive treatment to avoid infection through pruning wounds. Three commercial formulations were tested against a negative control (untreated) and a positive control (methylthiophanate). The trial was carried out in a dry-farmed, goblet-trained Tempranillo vineyard in Villalba de los Barros (Badajoz). The planting year was 2013. The trial was repeated for three seasons (2020, 2021 and 2022). Wood samples were collected at 30 days, 90 days and one year post treatment. For each treatment / year and sampling time, 20 vines were analyzed. A microbiological analysis of the wood was performed. The mean percentage of infection (MPI) by GTD-causing fungi and the percentage of *Trichoderma* spp. implantation were quantified. MPI was significantly higher in the negative control (16.03 ± 2.59) than in the treatments (< 4.5). The percentage of BCA implantation was significantly higher in *Trichoderma* treatments (50-100%) than in controls ($< 10.0\%$). No significant differences were found among the three formulations tested. The mean percentage of disease control was 100% at 30 and 90 days post-treatment, and around 50% at one year post-treatment. This work provides new information on the efficacy of these treatments in the growing conditions of Tierra de Barros.

Keywords: Esca, pruning, grapevines, Tierra de Barros, biological control agent (BCA), *Trichoderma*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades de la madera de la vid (EMV) limitan la producción vitivinícola en todo el mundo. En la actualidad, son la mayor causa de arranque, reconversión y restructuración del viñedo. En el año 2012, se estimó que este problema sanitario tenía un coste anual de 1.132 millones de euros para el sector vitivinícola (Hofsteter y col., 2012). Bajo el término de EMV se engloban una serie de sintomatologías como son la yesca, la eutipiosis o el brazo muerto (también llamado decaimiento por *Botryosphaeria*) que afectan a viñedos establecidos y plenamente productivos. Además de las enfermedades de Petri y pie negro en viñedos jóvenes (< 5 años). Desde la prohibición del arsenito sódico (2003), no existen materias curativas para tratar los síntomas foliares de enfermedades tan graves como la yesca. La

eliminación de toda la madera afectada (conocida como poda curativa) es la única herramienta para que un viticultor pueda contener la expansión de las EMV en su explotación.

En la bibliografía se han descrito más de 130 especies de hongos causantes de las EMV, de las cuáles en España se han citado en torno a la mitad (Gramaje y col., 2018, 2020). Estudios realizados en Extremadura, indican como principales factores causantes de la yesca: el tipo de material vegetal, la edad del viñedo y la presencia de hongos patógenos. La mayor incidencia de yesca (22%) se encontró en la variedad “Tempranillo” y las especies de hongos Ascomycetos de la familia Botryosphaeriaceae, *Phaeomoniella chlamydospora*, y los Basidiomicetos de la familia Hymenochaetaceae (como *Fomitiporia mediterranea*), los más abundantes y virulentos (Guera-Nogales y col., 2021; Dorado-Rico y col., 2021, 2022; Martín y col., 2022). Como consecuencia de la infección fúngica se produce una degradación de la madera y distintos síntomas en las hojas que provocan una reducción significativa en la producción de uva. Finalmente, las plantas de vid mueren de forma prematura.

Estudios orientados a profundizar en la epidemiología de las EMV han demostrado que los hongos patógenos penetran en la vid a través de las heridas anuales de poda (Luque y col., 2014). Por otro lado, los hongos del género *Trichoderma* han sido descritos como potenciales agentes de control biológico (ACB), porque se ha demostrado que actúan como parásitos y pueden limitar el desarrollo de otros hongos fitopatógenos. Se trata de un hongo de crecimiento rápido que ocupa el mismo nicho (espacio y nutrientes) que los hongos dañinos, pudiendo implantarse y proliferar desplazando a los patógenos. Desde el año 2018, en España, se ha autorizado la aplicación de varios formulados comerciales con *Trichoderma spp.* a las heridas de poda, para combatir las EMV. Se trata de una medida preventiva, orientada a reducir las nuevas infecciones por los hongos causantes de las EMV y limitar así el riesgo de que el viñedo desarrolle la enfermedad a medio y largo plazo.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de formulados comerciales del hongo *Trichoderma*, como tratamiento preventivo para evitar la infección por hongos causantes de EMV a través de las heridas de poda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El ensayo se ha realizado en la comarca de Tierra de Barros (Extremadura), sobre un viñedo de variedad Tempranillo injertado en Richter 110 y plantado en el año 2013. La parcela experimental se localiza en Villalba de los Barros (Badajoz) y es propiedad de J.A. Carcaboso Caballero (Sociedad Cooperativa Montevirgen). Se trata de un viñedo de conducción en vaso, con marco de plantación de 1,75 m x 1,75 m y cultivado en condiciones de secano. El viñedo experimental se dividió en cinco parcelas elementales, cada una de 1 ha aproximadamente. Sobre cada parcela elemental se aplicó un tratamiento diferente. En este trabajo se han ensayado tres formulados comerciales que contienen diferentes especies y cepas del hongo *Trichoderma*, frente a un control negativo (no tratado) y un control positivo (metil-tiofanato). Las características de cada formulado, fechas de tratamiento, el volumen de caldo y dosis aplicada se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos aplicados para proteger las heridas de poda y fechas de aplicación.

Tratamiento*	Acción	Composición	DOSIS / Ha	Fechas
Control (+) Cercobin 70 25437	Química	Metil-Tiofanato	1 Kg / 250 L	19/02/2020 04/03/2021 01/02/2022
TP1 Vintec® ES-00468	ACB	<i>Trichoderma atroviride</i> (cepa SC1) 1 x 10 ¹⁰ ufc/g	200 g / 200 L	19/02/2020 04/03/2021 01/02/2022
TP2 Blindar® 25924	ACB	<i>Trichoderma asperellum</i> (cepa ICC012) <i>Trichoderma gamsii</i> (cepa ICC080) 3 x 10 ⁷ ufc/g	1 Kg / 200 L	na 04/03/2021 01/02/2022
TP3 Esquive WP ® 25961	ACB	<i>Trichoderma atroviride</i> (cepa I-1237) 1 x 10 ⁸ ufc/g	2 Kg / 200 L	19/02/2020 04/03/2021 01/02/2022

*Tratamiento. Nombre comercial. N° Registro fitosanitario. ufc: unidades formadoras de colonia

Los tratamientos experimentales se llevaron a cabo en los días inmediatamente posteriores a la finalización de la poda (7-15 días). El ensayo se ha repetido durante tres campañas (2020, 2021 y 2022). En todas las anualidades, se respetaron las condiciones meteorológicas recomendadas por los proveedores de los formulados comerciales de *Trichoderma*, como son temperaturas > 10 °C en el momento de aplicación, y ausencia de lluvia y viento. La aplicación se realizó de forma parcialmente mecanizada mediante control dirigido con pistola, para evitar una deriva excesiva (ahorrando caldo) y lograr una óptima cobertura de todas las heridas de poda (Martín y col., 2021). El volumen de caldo consumido fue de 200 litros / hectárea. En el momento de la aplicación se tomó muestra del caldo aplicado y se trasladó al laboratorio para calcular la concentración efectiva de aplicación basada en la viabilidad ACB *Trichoderma*. Este análisis se llevó a cabo en condiciones asépticas, mediante siembra en medio agar extracto de malta (MEA) de diluciones seriadas (hasta 10⁻⁴) de 100 µl y recuento de ufc (unidades formadoras de colonias) equivalente a conidios germinados transcurridas 48-72 horas, según lo descrito por Méndez-Grano de Oro y col., 2022.

Análisis microbiológico de la madera

En cada anualidad (3 años), excepto en el año 2020 que no pudieron tomarse muestras a los 30 días post-tratamiento, se han recogido muestras de madera a los 30 días (1 mes), a los 90 días (3 meses) y a un año post tratamiento. Por cada tratamiento / año y momento de muestreo se recogieron y analizaron 20 trozos de madera, de 20 plantas diferentes elegidas al azar (5 plantas x 4 bloques de repetición -filas-). En total se analizaron 840 muestras de madera, que consistieron en fragmentos de 2-3 cm cortados a partir del extremo apical. El análisis microbiológico se realizó, siguiendo lo descrito previamente (Martín y col., 2021; Méndez-Grano de Oro y col., 2022), en condiciones asépticas y utilizando medio MEA (Agar Extracto de Malta) suplementado con cloranfenicol 25 mg/L. Las placas Petri fueron incubadas a 25 °C en oscuridad durante una semana. Transcurrido este tiempo se aislaron cultivos puros de todos los hongos morfológicamente diferentes. Los hongos aislados fueron seguidamente identificados basándonos en caracteres morfológicos y en caso necesario, fueron sometidos a una

extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) y posterior amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para una apropiada identificación por técnicas moleculares (secuenciación y análisis BLASTN de comparación con base de datos). Para ello se estudiaron diferentes regiones del ADN (Martín y col., 2019). Se cuantificaron el porcentaje medio de infección (PMI) por hongos causantes de EMV y el porcentaje de implantación de *Trichoderma spp.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dosis teórica vs dosis efectiva

Para el cálculo de la concentración teórica de aplicación se tomó como referencia la concentración recogida en la ficha del Registro de Producto Fitosanitarios (Tabla 1) y la dosis aplicada. Primero se calculó la concentración teórica de conidios viables para cada producto del ACB *Trichoderma* y después se comparó con el crecimiento de conidios viables tras realizar los ensayos en placa con las muestras de caldo recogidas a partir de la cuba de tratamientos en campo, para calcular la concentración efectiva de aplicación. Este análisis demostró la viabilidad del ACB en rangos muy próximos a la dosis teórica con las dosis aplicadas en campo (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones teóricas y efectivas de los tratamientos con el ACB *Trichoderma*

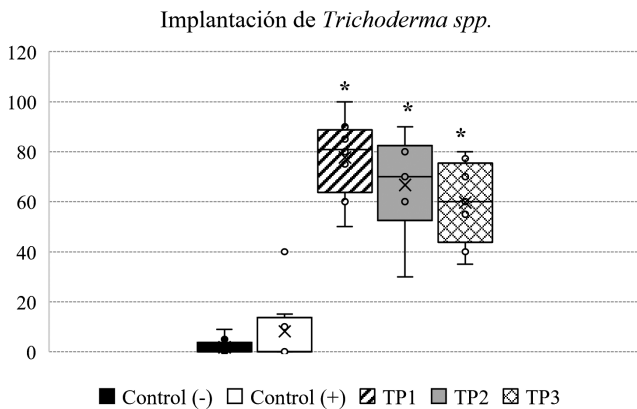
Tratamiento	Concentración teórica	Concentración efectiva
TP1	1×10^{10} ufc/g	$5,53 (\pm 2,18) \times 10^{10}$ ufc/g
TP2	3×10^7 ufc/g	$1,27 (\pm 0,92) \times 10^8$ ufc/g
TP3	1×10^8 ufc/g	$7,91 (\pm 2,24) \times 10^7$ ufc/g

Implantación del ACB *Trichoderma spp.* en madera de poda

El porcentaje medio de implantación o re-aislamiento en medio de cultivo del ACB *Trichoderma*, a partir de las muestras de madera fue significativamente superior en los tres tratamientos preventivos que en los dos controles (Figura 2). No se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los tres tratamientos. El resultado medio de todos los momentos de muestreo fue de $77,73 \pm 5,36$; $66,67 \pm 8,43$; y $59,66 \pm 5,41$ para los tratamientos TP1, TP2 y TP3, respectivamente. En general, los valores fueron mucho más altos a los 30 y 90 dpt (60-100) y descendieron al año post-tratamiento (30-82).

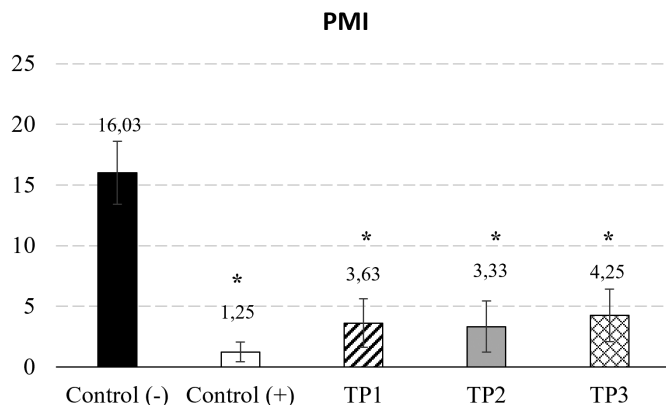
Figura 2. Porcentajes de implantación (re-aislamiento) del ACB *Trichoderma* en muestras de madera de poda tratada. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto a los controles (-) y (+).



Porcentaje medio de infección por hongos de madera

El porcentaje medio de infección por hongos causantes de las EMV fue del $16,03 \pm 2,59$ en las cepas sin tratar. Este dato resultó ser significativamente superior al encontrado en los demás tratamientos, sugiriendo la efectividad de proteger las heridas de poda. No se encontraron diferencias significativas los tres tratamientos con el ACB *Trichoderma* ni el control (+) (Figura 3).

Figura 3. PMI: Porcentaje medio de infección determinada por el aislamiento de hongos causantes de EMV. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto a los controles (-) y (+).



Las especies de hongos aisladas con mayor frecuencia fueron especies de la familia Botryosphaeria, *Cryptovalsa ampelina* y *Phaeoemoniella chlamydospora*.

Porcentaje medio de control de la enfermedad (PMCE)

Los resultados del PMCE calculado a los tres meses post-tratamiento (3 mpt) y antes de la poda del año siguiente (1 año post-tratamiento), se muestran en la Tabla 3. La protección con *Trichoderma* resultó en un 100% del control de la enfermedad a los 3 mpt, superando el control (+). Sin embargo, la efectividad disminuyó en torno al 50% transcurrido un año desde la aplicación del tratamiento, coincidiendo con el descenso en el porcentaje de implantación del ACB. Estos resultados justifican la necesidad de repetir el tratamiento con el ACB *Trichoderma* de forma anual.

Tabla 3. PMCE: Porcentaje medio de control de las EMV, basado en el PMI. Distintas letras indican diferencias significativas según el test LSD (diferencia mínima significativa de Fisher) con un nivel del 95% de confianza.

Tratamiento	3 meses post-tratamiento	1 año post-tratamiento
Control (+)	75 ± 14,43	100,00 ± 0,00 a
TP1	100 ± 0,00	55,74 ± 5,47 b
TP2	100 ± 0,00	44,63 ± 5,65 b
TP3	100 ± 0,00	50,00 ± 16,67 b

BIBLIOGRAFÍA

Dorado Rico, M.J.; Guerra, M.T.; Alarcón, M.V.; Martín, L. (2022). “La enfermedad de yesca: Factores causantes y susceptibilidad de los cultivares Tempranillo y Pardina”. *Fitopatología Publicación oficial de la Sociedad Española de Fitopatología*, 7, 2022, pág. 223.

Dorado Rico, M.J.; Mendez Grano de Oro, L.; Alarcón, M.V.; Garcia-Garcia, B.; and Martin, L. (2021). “Caracterización patogénica de especies de la familia Botryosphaeriaceae causantes de Enfermedades de la Madera de la Vid.” *Actas de Horticultura. Comunicaciones Técnicas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. XVI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, 86, 2021, págs. 175-178.

Gramaje, D.; Armengol, J.; Barajas, E.; Berbegal, M.; Chacón, J.L., Cibrián-Sabalza, J.F.; Díaz-Losada, E.; López-Manzanares, B.; Muñoz-Gómez, R.M.; Martínez-Diz, M. P.; Rubio, J. A.; Sagüés Sarasa, A. (2020). “Guía sobre las enfermedades fúngicas de la madera de la vid.” Reunión Grupo de Trabajo de experimentación en viticultura y enología. 34ª Reunión: Centro de Transferencia Agroalimentaria: Gobierno de Aragón: Zaragoza: 10 y 11 de abril de 2019. ANEXO. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España). 2020.

Gramaje, D.; Urbez-Torres, J.R. and Sosnowski, M.R. (2018). “Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects”. *Plant Dis.* 102(1), 2018, págs 12-39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>

Guera-Nogales, J.J.; Dorado-Rico, M.J.; Colino, M.I.; Santiago, R.; Flores-Roco, A.; Martín, L. (2021). “Identificación de especies de Botryosphaeriaceae en plantas con síntomas de enfermedades de la madera de la vid en Extremadura.” *Actas de Horticultura. Comunicaciones Técnicas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. XVI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, 86, 2021, págs. 179-182.

Hofstetter, V.; Buyck, B.; Croll, D.; Viret, O.; Couloux, A. and Gindro, K. (2012). “What if Esca disease of grapevine were not a fungal disease?” *Fungal Divers.* 54(1), 2012, págs. 51-67. doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z

Luque, J.; Elena, G.; García-Figueras, F.; Reyes, J.; Barrios, G.; Legorburu, F.J. (2014). "Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain)". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 2014, págs. 134-143.

Martín, L.; García-García, B.; Alguacil, M del M. (2022). "Interactions of the Fungal Community in the Complex Patho-System of Esca, a Grapevine Trunk Disease." *Int J Mol Sci*. 23, 2022; 14726. <https://doi.org/10.3390/ijms232314726>.

Martín, L.; Senero, M.; Pérez, J.; Dorado, M.J.; Bueno, M. (2021). "Control integrado de las enfermedades de la madera de la vid a través de la protección de las heridas de poda". *Enoviticultura*, 68, 2021, págs. 18-25.

Méndez-Grano de Oro, L., Dorado-Rico, M.J.; Guera-Nogales, J.J.; Martín, L. (2022) "Control biológico y preventivo de las enfermedades de la madera de la vid: Resultados de la aplicación de Blindar® en campo". *PHYTOMA*, 344, 2022, págs. 54-57.