



winetech plus  
comunidad de innovación y  
nuevas tecnologías en viticultura y  
elaboración de vino



SUDOE  
Interreg IV B



UE/EU - FEDER/ERDF

## Desarrollo de estrategias naturales para el control de enfermedades de madera de vid



Instituto de Investigación  
de la viña y el vino



Dr. Juan José Rubio Coque  
Julio, 2014

1).- **DEFINICIÓN.**

El término enfermedades de madera de vid (*grapevine trunk diseases*) define un conjunto de patologías producidas por hongos que afectan a la madera de la vid (tronco, ramas y raíces) provocando en ella diferentes sintomatologías que desencadenan una pérdida de vigor de la planta que provocará la consecuente pérdida de producción, llegando en algunos casos incluso a producir su muerte.

Es por ello que este conjunto de patologías también son conocidas como decaimientos de la vid (*grapevine decline*).









Colapso y muerte de la planta

Brazo con brote raquítico mostrando un claro retraso en el crecimiento

## REPERCUSIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE VID

Las enfermedades de madera de vid son la mayor amenaza a la que tienen que enfrentarse los viticultores y viveros de vid en todo el mundo por varios motivos:

**I) - Gran importancia económica del sector vitivinícola:**

- \* España dedica 1,2 millones de hectáreas al cultivo de la uva (tercer lugar en extensión detrás de cereales y olivar).
- \* El sector factura unos 4.800 millones/€ al año (aproximadamente el 0.7% del PIB).

**II) - Generan graves pérdidas económicas** (disminución del rendimiento de la planta, pérdida de calidad de la uva, muerte de plantas, gastos de arrancamiento y replantación, etc.).

- \* Si asumimos un coste anual por Ha de 600 € en España (1.2 millones de Ha de viñedo) supone unas pérdidas anuales de 720 millones de euros
- \* En Castilla y León (68.250 Ha) supone unas pérdidas anuales de casi 41 millones de euros

**III) - Total ausencia de métodos de control (antifúngicos y antibacterianos) efectivos.**

**IV) - Incidencia del problema elevada.** En Castilla y León se ha pasado de un grado de afectación del 1.8% en el año 2001 a un grado de afectación del 10.5% en el año 2007 .

**V) - El problema no sólo afecta a los viticultores de todo el mundo sino que es también un grave problema para los viveros de planta de vid:** varios estudios indican que en una elevada proporción las plantas se infectan en el vivero.

### Proyección hipotética del grado de afectación de plantas de vid en Castilla y León suponiendo un aumento anual del 3%



EL DESAFÍO DE LAS ENFERMEDADES DE MADERA DE VID:

¿CÓMO ES POSIBLE QUE A PESAR DE LA GRAVE AMENAZA QUE SUPONEN NO EXISTA ACTUALMENTE EN EL MERCADO UN MÉTODO DE CONTROL EFECTIVO?



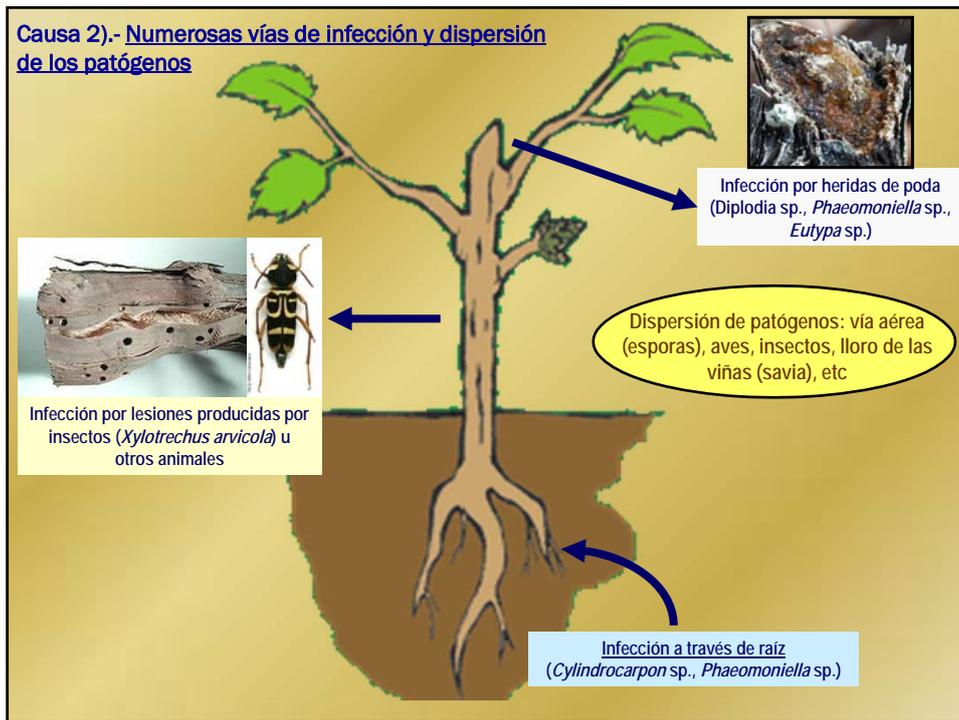
Causa 1).- Nos enfrentamos no a una única patología sino a un conjunto de patologías.

### Patologías fúngicas

- ✓ Enfermedad de Petri: *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*.
- ✓ Yesca: *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Secundariamente *Stereum hirsutum* y *Fomitiporia mediterranea*.
- ✓ Pie negro: Se asocia a distintas especies del género "*Cylindrocarpon*", en España principalmente a *C. macrodidymum* y *C. liriodendri*.
- ✓ Síndrome del brazo muerto: *Diplodia seriata* y *D. mutila*.
- ✓ Eutipiosis: *Eutypa lata*.
- ✓ Excoriosis: *Phomopsis viticola*.

### Patologías bacterianas

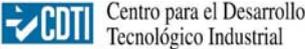
- ✓ Necrosis bacteriana del viñedo: *Xylophilus ampelinus*
- ✓ Enfermedad de Pierce: *Xylella fastidiosa*



Las enfermedades de madera de vid y Bodegas Vega Sicilia S.A.:



✓ Proyecto 1).- "Análisis de la incidencia de enfermedades de madera en Finca Vega Sicilia y viñedos de Bodegas Pintia y búsqueda de estrategias de defensa respetuosas con el medio ambiente". Bodegas Vega Sicilia S.A. Septiembre, 2007-Agosto, 2010.

✓ Proyecto 2).- "Enfermedades de Madera de Vid en Fase 2: Análisis de la eficacia de agentes antifúngicos naturales y agentes de biocontrol en viñedo experimental. Búsqueda de péptidos antifúngicos frente a hongos de enfermedades de madera de vid" Bodegas Vega Sicilia S.A. Septiembre, 2010-Agosto, 2013.

Objetivo1).- Selección de antifúngicos naturales para su aplicación en heridas de poda a fin de evitar la infección por esta vía



*Selección de 26 compuestos/extractos con capacidad antifúngica*

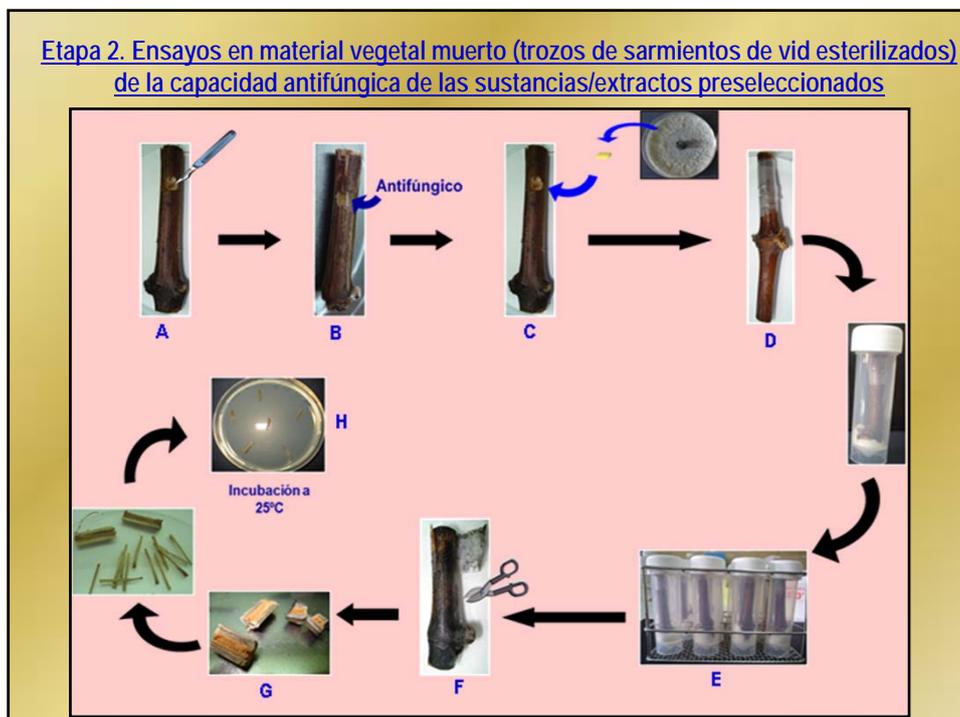


Tabla 1)- Porcentaje de inhibición de los compuestos/extractos ensayados como antifúngicos frente a varios hongos responsables de enfermedades de madera de vid en ensayos con sarmientos de vid (material vegetal muerto). Se resaltan en amarillo los antifúngicos seleccionados para ensayos *in vivo*

	Antif. 1	Antif. 3	Antif. 11	Antif. 13	Antif. 20
<i>D. seriata</i>	92.0%	100%	86.5%	100%	100%
<i>P. chlamydospora</i>	100%	100%	94.0%	100%	100%
<i>C. macrodidymum</i>	33.0%	100%	85.3%	95.5%	100%
<i>E. lata</i>	78.5%	100%	50.0%	100%	95.0%

**Etapa 3. Ensayos en material vegetal vivo: plantas de vid crecidas en viñedo experimental.**

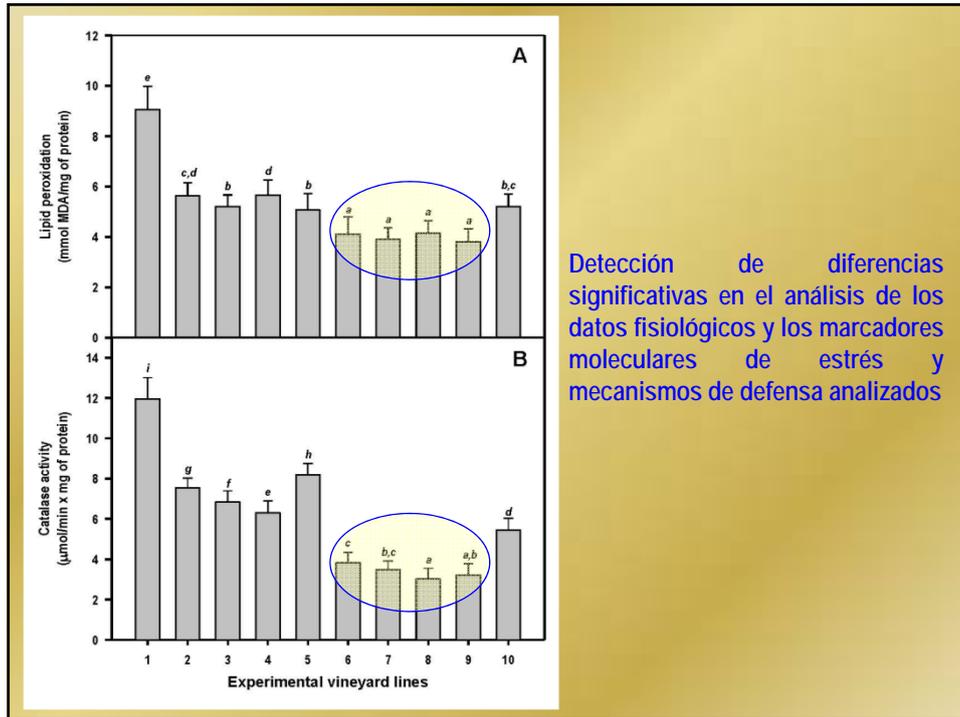
**A**

- Line 1.- Infected plants: *D. seriata* and *P. chlamydospora* applied on pruning wounds
- Line 2.- Chitosan oligosaccharide (25 mg/mL)
- Line 3.- Garlic extract (10%)
- Line 4.- Vanillin (5 mg/mL)
- Line 5.- Chitosan oligosaccharide (25 mg/mL)-garlic extract (10%)-vanillin (5 mg/mL) (CGV2 mix)
- Line 6.- Chitosan oligosaccharide and pathogens *D. seriata* and *P. chlamydospora* applied on pruning wounds
- Line 7.- Garlic extract and pathogens *D. seriata* and *P. chlamydospora* applied on pruning wounds
- Line 8.- Vanillin and pathogens *D. seriata* and *P. chlamydospora* applied on pruning wounds
- Line 9.- CGV Mix and pathogens *D. seriata* and *P. chlamydospora* applied on pruning wounds
- Line 10.- Negative control (untreated plants)

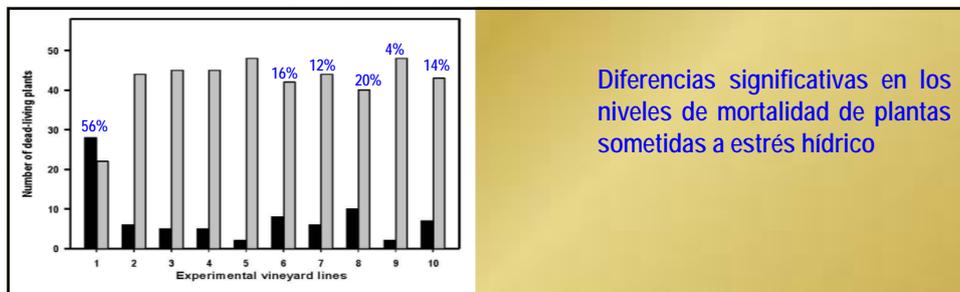
**B**

```

    graph TD
      A["April, 2009 (EV1) / April, 2011 (EV2):  
experimental vineyards planting"] --> B["December, 2009 (EV1) / December, 2011 (EV2):  
pruning and pathogen application on  
pruning wounds (24 h after pruning)"]
      B --> C["June, 2010 (EV1) / June 2012 (EV2):  
collection of growth data and leaves for  
assays"]
      C --> D["June, 2011 (EV1) / June, 2013 (EV2): taking  
collection of growth data and leaves for  
assays"]
      D --> E["July-august, 2011 (EV1) / July-august, 2013 (EV2):  
water stress induced (mortality data  
acquired)"]
      E --> F["September, 2011 (EV1) / September, 2013 (EV2):  
plants removed from soil. Isolation of  
pathogenic fungi from wood"]
    
```



Detección de diferencias significativas en el análisis de los datos fisiológicos y los marcadores moleculares de estrés y mecanismos de defensa analizados



Diferencias significativas en los niveles de mortalidad de plantas sometidas a estrés hídrico

Table 3 - Percentage of various fungal pathogens isolated from plants of the experimental vineyards. A description of every line is showed in Fig. 1.

Phytopathogenic fungi isolated from trunks (wood samples taken 10-30 mm below the inoculation point) (%) <sup>a</sup>	Health status of plants prior to planting <sup>b</sup>									
	Line 1	Line 2	Line 3	Line 4	Line 5	Line 6	Line 7	Line 8	Line 9 <sup>c</sup>	Control Line 10
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0	1.57	0.29	0	0	0	0	0	0	0.14
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	1.57	1.00	0	0.57	0.29	0	0.29	0	0	0.43
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	0	0	0	0	0.14	0.14	0	0	0	0
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	0.14	0.29	0	0	0	0	0	0.14	0	0
<i>D. seriata</i>	0.14	6.14	0	0	0	0	0.57	0	1.00	0
<i>I. macrodidyma</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0	0
<i>P. aleophilum</i>	0	0.86	0	0	0	0	0	0	0.43	0
<i>P. chlamydospora</i>	1.14	9.71	0.14	0	0	0.29	1.14	0.14	0.57	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	1.14	0	0.29	0	0.14	0	0	0	0

<sup>a</sup> Total number of xylem (wood) segments (2 stubs per plant, 7 wood segments per stub, and 25 grapevine plants analyzed per line) that were infected by fungi expressed as a percentage respect to the total number of segments analyzed per line.

<sup>b</sup> Data corresponding of to the average of 2 batches of 25 plants analyzed at February 2009 and February 2011 prior to planting experimental vineyards. Two stubs per plant were analyzed corresponding to a region 10-30 mm below the location of the buds.

<sup>c</sup> CGV2 mix applied: chitosan oligosaccharide (25 mg/mL)-garlic extract (10%)–vanillin (5 mg/mL)

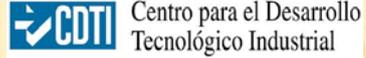


## El manejo integrado de las enfermedades de la madera de la vid

\* Punto 2: Actuaciones en viveros de vid



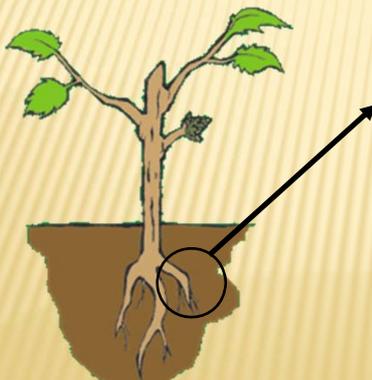
Aumento de la tasa de infección por hongos patógenos



Las enfermedades de madera de vid y Viveros Villanueva Vides S.L.:

Aislamiento y caracterización de agentes de biocontrol específicos para combatir la infección de plantas de vid en vivero por el hongo fitopatógeno *Cylindrocarpon* sp., diseño de estrategias de control de hongos de madera en puntos críticos del proceso e influencia de la fertilidad del suelo en la supervivencia de hongos patógenos.

✓ Objetivo 1: Aislamiento y caracterización de agentes de biocontrol específicos para combatir la infección de plantas de vid en vivero por el hongo fitopatógeno *Ilyonectria* sp. ("*Cylindrocarpon*" sp.)



1).- BCAs con capacidad para estimular la formación de sistema radicular (paso crucial en el establecimiento del vivero en tierra)

2).- BCAs con capacidad para inhibir el desarrollo y colonización de *Ilyonectria* sp. del aparato radicular

3).- BCAs con capacidad para establecerse y colonizar el aparato radicular de la planta de vid

-- **Objetivo 1.** Aislamiento y caracterización de agentes de biocontrol bacterianos contra hongos de enfermedades de madera de vid (preferentemente *Cylindrocarpon* sp., y *Phaeoaniella chlamydospora*) para combatir la infección de plantas de vid en vivero a través de raíz.

**Tarea 1.1)- Aislamiento (rizosfera y microorganismos endofíticos), selección e identificación de estreptomicetos que actúen como BCAs específicos contra hongos responsables de enfermedades de madera (ensayos en placa).**

A).- Aislamiento de estreptomicetos que actúen como BCAs contra hongos causantes de enfermedades de madera.  
Se han realizado dos tipos de aislamiento:

1).- **Aislamiento de bacterias endofíticas aisladas a partir del interior de raíces** de 2 plantas de 9 meses recogida en diciembre de 2012 en Viveros Villanueva.

- El método de Taechowisan et al., 2003.
- El método de Li et al., 2012.

Las bacterias endofíticas se aislaron en 4 medios de cultivo diferentes: **medio DPA** (10 aislados; D1-D10), **medio AC** (21 aislados; A1-A21), **medio ISP2** (18 aislados; I1-I18) y **medio SAA** (3 aislados; S1-S3).

Las bacterias se diferenciaron inicialmente en base a criterios fenotípicos fácilmente observables (color de la colonia, formación o no de micelio aéreo, producción de pigmentos, etc). Utilizando esta metodología se aislaron un total de 52 aislados que parecían diferentes.

2).- **Aislamiento de bacterias rizosféricas aisladas a partir de la rizosfera** (tierra en contacto con las raíces) de 4 plantas de 9 meses recogida en diciembre de 2012 en Viveros Villanueva (medio AC).

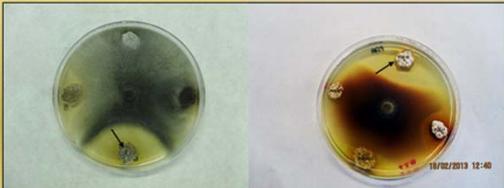


**Se han obtenido un total de 52 aislados endofíticos y 94 aislados rizosféricos**

**Tarea 1.1)- Aislamiento (rizosfera y microorganismos endofíticos), selección e identificación de bacterias que actúen como BCAs específicos contra hongos responsables de enfermedades de madera (ensayos en placa).**

B).- **Selección de bacterias endofíticas y rizosféricas por su capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *D. seriata* e *I. macrodidyma* (*C. macrodidymum*).**

Selección mediante la técnica de inhibición de crecimiento radial en placas de medio PDA en las que se sembraron en su centro los hongos fitopatógenos (Figura 1):



**Figura 1).**- Antagonismo de cepas de estreptomicetos endofíticos y rizosféricos frente a los hongos fitopatógeno *D. seriata* (A) e *Ilyonectria macrodidyma* (*Cylindrocarpon macrodidymum*) (B) determinado por la técnica del bioensayo (o inhibición de crecimiento radial). Obsérvese en los clones señalados por una flecha la inhibición del crecimiento sobre los hongos fitopatógenos.

<b>TABLA 1</b>	Aislados activos frente a <i>D. seriata</i> (%)	Aislados activos frente a <i>I. macrodidyma</i> (%)	Clones preseleccionados para análisis posteriores
<b>Bacterias endofíticas</b>	9 de 94 (9.6%)	5 de 94 (5.3%)	P2E/I1, P2E/I5, P2E/A12, P2E/A18 y P3E/S1 (clones activos frente a ambos patógenos)
<b>Bacterias rizosféricas</b>	29 de 92 (31.5%)	13 de 92 (14.1%)	P2s-3, P2s-10, P1s-18, P3s-21 y P4s-10 (clones con mayor actividad frente a ambos patógenos)

**Tarea 1.2).- Selección de los BCAs para controlar el desarrollo de hongos fitopatógenos en material vegetal esterilizado**



Clon	Frecuencias (%) de aislamiento de <i>D. seriata</i> en astillas de sarmientos	Grado de inhibición (%) del desarrollo de <i>D. seriata</i> frente al control.
Control positivo de <i>D. seriata</i>	46.5%	100%
Control negativo sin <i>D. seriata</i>	0%	0%
P2E/11 (Clon E1)	40.0%	14.0%
P2E/15 (Clon E2)	31.2%	32.9%
P2E/A12 (Clon E3)	34.5%	25.8%
P2E/A18 (Clon E4)	25.4%	45.4%
P3E/S1 (Clon E5)	8.5%	81.7%
P2s-3 (Clon R1)	26.8%	42.3%
P2s-10 (Clon R2)	10.5%	77.4%
P1s-18 (Clon R3)	13.8%	70.3%
P3s-21 (Clon R4)	9.8%	78.9%
P4s-10 (Clon R5)	30.2%	35.0%

**Tarea 1.3).- Análisis de la capacidad de los BCAs seleccionados para frenar el desarrollo de hongos de madera de vid en estaquillas de vid sometidas a enraizamiento en tierra (establecimiento de vivero experimental)**

✓ Establecimiento de vivero experimental (1000 plantas portainjertos Rister 110 (Bravosol) injertadas con Tempranillo blanco.

✓ **Metodología:**

I).- Aplicación de bacterias (clones R1 a R5 y E1 a E5; a plantas injertadas (22 de mayo de 2013). Se realizó por duplicado sobre 1 lote control de 50 plantas y 10 lotes de 45 plantas tratadas con 10 estreptomicetos seleccionados.

II).- Los lotes de plantas se introdujeron en cubos cuyo fondo contenía solución de hormona de enraizamiento (preparada por Viveros Villanueva) más las bacterias aisladas (cultivos de 50 ml en caldo extracto de malta) directamente sobre la solución de hormona de enraizamiento (Figura 2).



III).- Las plantas se mantuvieron en la solución de hormona conteniendo las bacterias durante 48 horas



**Figura 2:** Aplicación de bacterias seleccionadas a plantas injertadas por inmersión en solución de enraizamiento

IV).- Transcurrido este tiempo las plantas se parafinaron y se pusieron en campo (Figura 3).

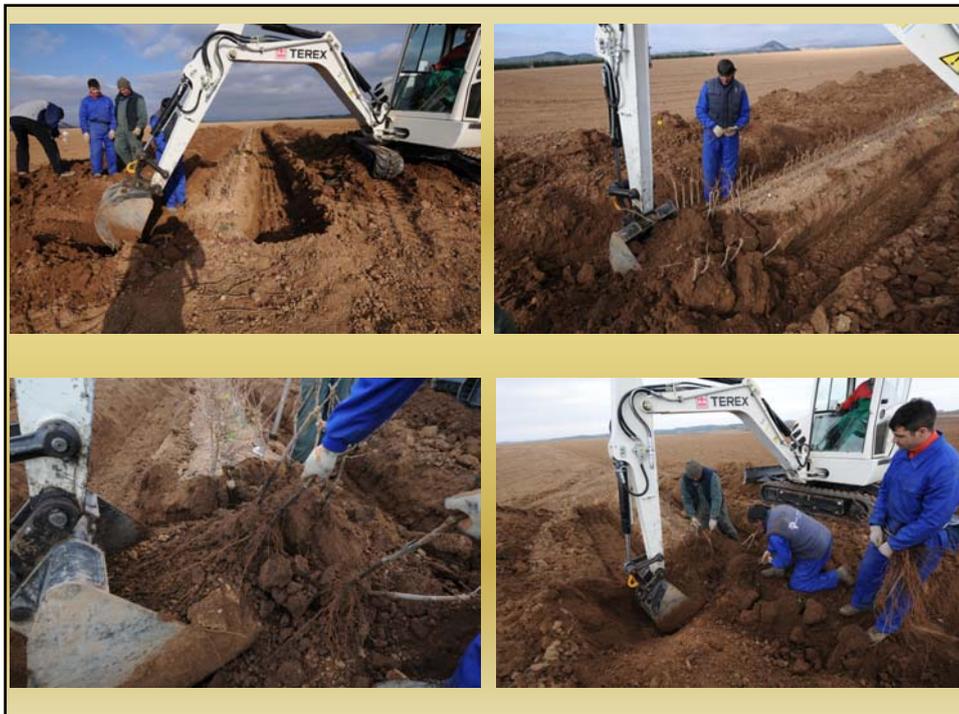


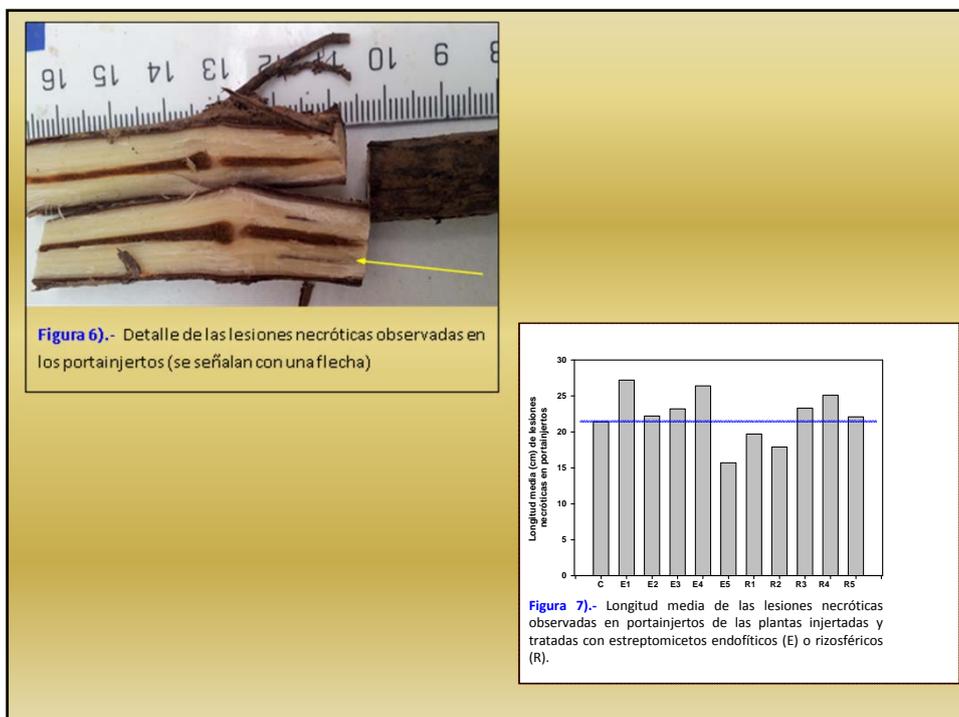
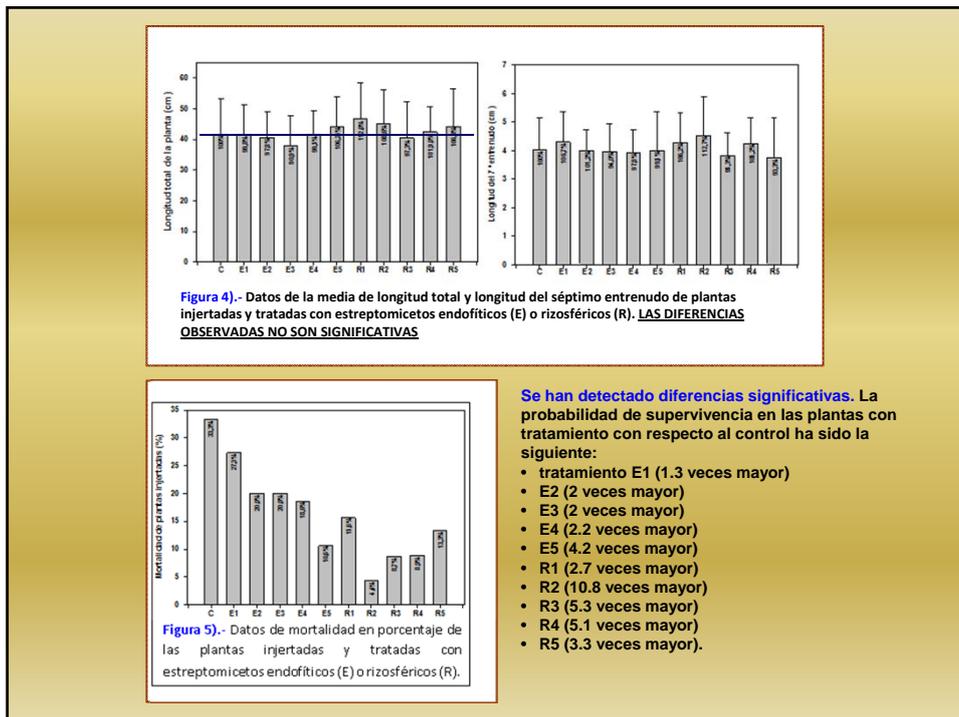
**Figura 3).**- Establecimiento de un vivero experimental para comprobar el efecto de bacterias endofíticas y rizosféricas sobre el desarrollo de plantas injertadas de vid y su infección por hongos fitopatógenos a través del aparato radicular

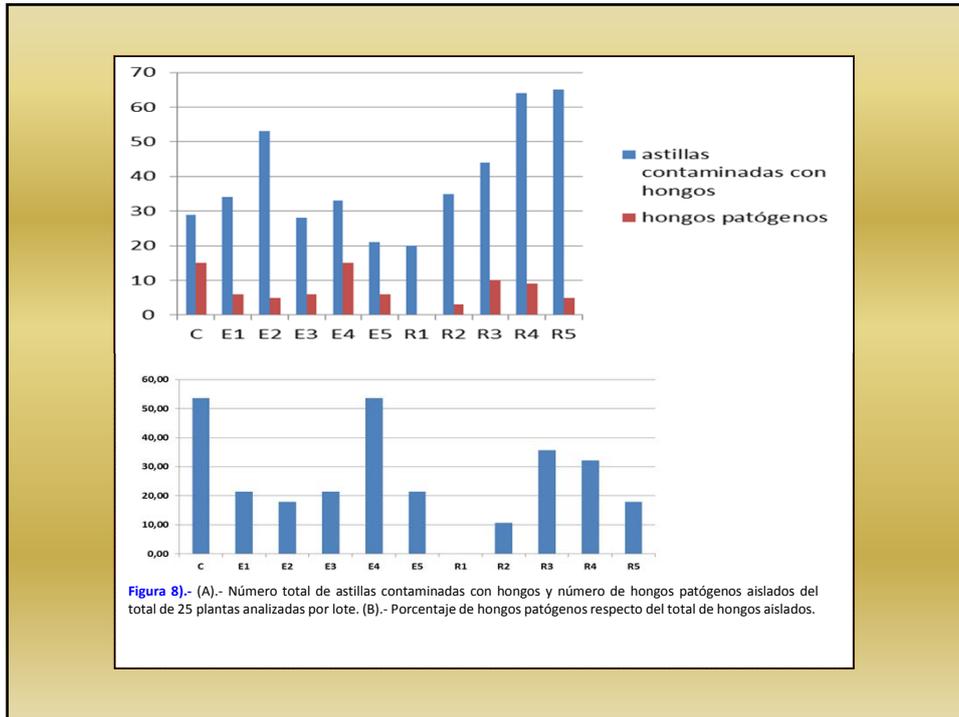
V).- Desarrollo de plantas en campo.

VI).- Recogida de datos en campo (30 de julio de 2013). Medida de longitud total de las plantas y longitud del séptimo entrenudo. Además se tomaron datos de mortalidad de cada lote de plantas.

VII).- En noviembre-diciembre de 2013 se procedió al arrancamiento de las plantas para determinar peso total del aparato radicular, diámetro de las 5-6 raíces principales y se procederá al aislamiento y cuantificación de patógenos en el punto de inserción de raíz.







### El manejo integrado de las enfermedades de la madera de la vid

\* Punto 3: Tratamiento de plantas adultas enfermas

Desarrollo de tecnologías para hacer llegar tratamientos al interior de las plantas





**Desarrollo de estrategias naturales para el control de enfermedades de madera de vid**



Dr. Juan José Rubio Coque  
Julio, 2014