



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

-Trabajo Fin de Máster -

-Máster en Producción, Protección y Mejora Vegetal-

**Caracterización patogénica de los hongos
asociados al decaimiento del almendro en
plantaciones jóvenes en Andalucía**

-Begoña Isabel Antón Domínguez-

**Grupo Patología Agroforestal
Departamento de Agronomía**

Directores:

Dr. D. Antonio Trapero Casas

Dr. D. Carlos Agustí Brisach

Imagen portada: Robinson, W., 1898. The garden. An illustrated weekly journal of horticulture in all its branches. London, England: The Garden Office.



Caracterización patogénica de los hongos asociados al decaimiento del almendro en plantaciones jóvenes en Andalucía

Por: Begoña Isabel Antón Domínguez

**Grupo Patología Agroforestal, Departamento de Agronomía,
Universidad de Córdoba.**

Fdo: Dr. Antonio Trapero Casas

Fdo: Dr. Carlos Agustí Brisach

Fdo: Begoña Isabel Antón Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que han intervenido, directa o indirectamente, en este Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, expresar mi admiración al Dr. Antonio Trapero Casas y agradecerle no solo el haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo, sino también el haberme transmitido sus conocimientos en el campo de la patología vegetal.

Al Dr. Carlos Agustí Brisach por su infinita ayuda a lo largo de todo el proyecto, por su apoyo y ánimo constantes. Una persona que bajo mi punto de vista, posee una constancia y pasión infinita hacia su trabajo, un ejemplo a seguir tanto profesional como personalmente.

Agradecer también a Ana López Moral por su gran ayuda en la preparación de ensayos y al resto de los miembros del Grupo de Patología Agroforestal por hacerme sentir como una más en todo momento.

A Octavio Arquero Quílez y María Lovera Manzanares por su buena predisposición y ayuda en la toma de muestras y visitas a campos comerciales. Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos PPTRATRA-2016.00.6 (IFAPA, Consejería de Agricultura, Junta de Andalucía) y RTA2017-00009-C04-03 (INIA, Madrid). Agradecer la colaboración de las OPFHs Crisolar y Mañán, y la empresa privada Almendras Francisco Morales.

Por último, agradecer a todas las personas importantes de mi vida, por confiar en mí, estar a mi lado, por dárme todo absolutamente todo y no pedir nada. Os doy las gracias de corazón.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cultivo del almendro.....	1
1.2. Situación actual de las plantaciones de almendro en Andalucía.....	1
1.2.1. Decaimiento de plantaciones jóvenes de almendro	2
1.2.1.1. Síntomas y posibles agentes causales asociados a la enfermedad	2
1.2.1.2. Biología y epidemiología	3
1.2.1.3. Control.....	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Aislados fúngicos.....	8
3.2. Ensayos en rama cortada	8
3.2.1. Material vegetal	8
3.2.2. Inoculación e incubación	8
3.2.2. Diseño experimental	9
3.3. Ensayos en rama en condiciones de campo	9
3.3.1. Material vegetal e inoculación.....	9
3.3.2. Diseño experimental	9
3.4. Reaislamientos.....	11
3. 5. Evaluaciones y análisis estadísticos.....	11
4. RESULTADOS	13
4.1. Ensayos en rama cortada	13
4.2. Ensayos en rama en condiciones de campo	13
4.3. Correlaciones	16
4.4. Reaislamientos.....	16
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23
8. ANEJO ESTADÍSTICO	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de la enfermedad en almendros jóvenes en plantaciones intensivas en Andalucía. a, b , Síntomas de producción de goma en (a) la cruz, y en (b) el tronco; c , Marchitamiento y necrosis de hojas en almendros que empiezan a mostrar los primeros síntomas de la enfermedad; d, e , Decaimiento general y muerte progresiva de los árboles afectados; f , Decoloración interna de la madera ascendente desde la parte basal del patrón; g , Detalle del avance de la decoloración interna de la madera desde el posible punto de infección (rama) hasta el tronco; h-i , Síntomas internos en la madera típicos de hongos de madera, incluyendo necrosis sectoriales y punteaduras negras correspondientes a vasos xilemáticos muertos.	5
Figura 2. Ciclo de la enfermedad.	6
Figura 3. Decoloración interna de la madera en rama cortada de almendro cv. Soleta a las 3 semanas tras la inoculación con discos de PDA con micelio (0 , rama de control no inoculada) de los 7 aislados representativos seleccionados por su patogenicidad: (1) <i>Botryosphaeria dothidea</i> aislado ColPat-502, (2) <i>Neofusicoccum parvum</i> aislado ColPat-497, (3) <i>Macrophomina phaseolina</i> aislado ColPat-490, (4) <i>Phomopsis amygdali</i> aislado ColPat-521, (5) <i>Fusarium oxysporum</i> aislado ColPat-548, (6) <i>Eutypella microtheca</i> aislado ColPat-494, y (7) <i>Dothiorella iberica</i> aislado ColPat-372.	13
Figura 4. Decoloración interna de la madera y seca de ramas de almendro cv. Soleta a los 3 meses tras la inoculación en campo con discos de PDA con micelio de los 7 aislados representativos seleccionados en este estudio: (A-B) <i>Neofusicoccum parvum</i> aislado ColPat-497, (C-D) <i>Phomopsis amygdali</i> aislado ColPat-521, (E) <i>Botryosphaeria dothidea</i> aislado ColPat-502, (F) <i>Eutypella microtheca</i> aislado ColPat-494, (G) <i>Pleurostoma richardsiae</i> aislado ColPat-550, (H) <i>Phaeoacremonium krajdennii</i> aislado ColPat-520, y (I) <i>Dothiorella iberica</i> aislado ColPat-372.	14
Figura 5. Severidad de la enfermedad (longitud de la lesión, mm) en las ramas cortadas A , y en campo B , de almendro cv. Soleta a las 3 semanas y 3 meses, respectivamente, después de la inoculación con discos de PDA con micelio de los aislados fúngicos seleccionados para cada experimento. Para cada aislado, las columnas representan la media de tres cámaras húmedas con cinco ramas cada una en las inoculaciones artificiales (A) y la media de cinco almendros con dos ramas inoculados cada uno en los experimentos de campo (B). En cada gráfico, las barras con letras comunes no difieren significativamente según el test HSD de Tukey ($P = 0,05$). Las líneas horizontales en las barras representan el error estándar de la media.	15

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados fúngicos obtenidos de almendros afectadas por gomosis y decaimiento general en Andalucía utilizados en este estudio.....	10
Tabla 2. Frecuencia de reaislamiento (%) de los aislados fúngicos utilizados en las pruebas de patogenicidad realizadas en este estudio.....	17

RESUMEN

En los últimos años, el cultivo del almendro está sufriendo una transición importante, pasando de zonas tradicionales de cultivo marginal a zonas con mejores condiciones edafoclimáticas y cultivo más tecnificado. Este cambio está repercutiendo en un aumento del rendimiento de las cosechas, pero a su vez en una mayor incidencia de enfermedades, algunas de ellas consideradas secundarias o desconocidas para este cultivo, como son las enfermedades de la madera. En este sentido, desde 2016, se viene observando una nueva problemática fitosanitaria relacionada con gomosis, decoloración interna de la madera, muerte progresiva y decaimiento general de los árboles en plantaciones intensivas de almendros recientemente establecidas en Andalucía. La etiología de las distintas especies fúngicas involucradas en este síndrome es poco conocida ya que nos encontramos ante una enfermedad compleja asociada con una gran diversidad de hongos. Hasta el momento, en Andalucía se han descrito las siguientes especies asociadas a este síndrome: *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Eutypella microtheca*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium krajdinii*, *Phomopsis amygdali* y *Pleurostoma richardsiae*. Sin embargo, su patogenicidad en almendro en nuestras condiciones de cultivo aún no ha sido demostrada, por lo que la finalidad de este trabajo ha sido evaluar la patogenicidad de todas ellas para determinar los posibles agentes causales. Los ensayos de patogenicidad se realizaron inoculando tanto ramas cortadas en condiciones controladas, como ramas en árboles en condiciones de campo, utilizando en todos los casos material vegetal de la variedad Soleta. La inoculación se realizó por el método de herida y deposición de disco de agar con micelio. Las evaluaciones se llevaron a cabo a las tres semanas y a los tres meses tras la inoculación para rama cortada y campo, respectivamente, evaluando la longitud de la lesión (mm). *Neofusicoccum parvum* fue la especie más virulenta, mostrando mayores lesiones y desarrollo de goma en las ramas inoculadas en campo. Los resultados sugieren que las especies de la familia Botryosphaeriaceae podrían considerarse como uno de los principales agentes causales de la enfermedad. No obstante, es necesario seguir investigando para profundizar en la patogenicidad de los hongos asociados a esta compleja enfermedad.

Palabras clave: Decaimiento, etiología, hongos de madera, patogenicidad, *Prunus dulcis*, virulencia.

ABSTRACT

During the last few years, almond crop has undergone a major shift from traditional marginal areas to others with better soil, weather and growth conditions. It has resulted in an increase in farm yields, but in turn in a higher incidence of diseases which are considered secondary or unknown for this crop, such as trunk and wood diseases. Thus, since 2016, a new problem associated with gummosis, internal wood discolouration, dieback and general decline has been observed in intensive new almond plantations in Andalusia. The etiology of this syndrome is still unknown since we are faced with a complex disease associated with a broad diversity of fungi. So far, the following species associated with this syndrome have been described in Andalusia: *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Eutypella microtheca*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium krajdennii*, *Phomopsis amygdali* and *Pleurostoma richardsiae*. However, their pathogenicity in almond under our grown conditions has not been demonstrated yet. Thus, the main objective of this work has been to evaluate the pathogenicity of all them to determine the possible causal agents of the disease. The pathogenicity tests were carried out inoculating detached branches under laboratory conditions and attached branches under field conditions. In both cases, branches of almond of cv. Soleta were inoculated by the method of wounding and deposition of mycelial agar plugs. The lesion length (mm) developed for each species tested was conducted at three weeks and at three months after the inoculation for detached and attached branches, respectively. *Neofusicoccum parvum* was the most virulent species, showing the largest lesions and gummosis in the inoculated branches in the experiments under field conditions. The results suggest that the species belonging to Botryosphaeriaceae could be considered as one of the main causal agents of the disease. However, further research is needed to determine the pathogenicity of the fungi associated with this complex disease.

Keywords: Etiology, decline, pathogenicity, *Prunus dulcis*, trunk pathogens, virulence.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo del almendro

El almendro [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] es una especie cultivada típicamente mediterránea, de gran importancia, no solo por la extensión dedicada a su cultivo, sino también debido a su demarcación tradicional en áreas con condiciones edafoclimáticas y orográficas desfavorables y su cultivo en secano (Arquero *et al.*, 2013). La implantación de este cultivo ha experimentado un aumento considerable en los últimos años debido principalmente al buen mercado de la almendra, intensificándose y extendiéndose también a zonas con condiciones ambientales más favorables para su desarrollo (Lovera *et al.*, 2016; Ollero-Lara *et al.*, 2016; López-Moral *et al.*, 2017).

La producción mundial se encuentra actualmente dominada por California (EE.UU), seguida de España y Australia, que entre los tres suponen el 93% de la producción mundial (Junta de Andalucía, 2016). La superficie mundial dedicada al cultivo del almendro es de aproximadamente 1.925.887 ha, de las cuales 744.135 ha se encuentran en la UE (FAO, 2017). España es el primer país en superficie cultivada de almendro teniendo unas 547.073 ha, localizándose en las Comunidades del litoral mediterráneo siendo Andalucía la región con mayor superficie dedicada a este cultivo con ≈ 157.412 ha (MAPA, 2017). Sin embargo, el rendimiento medio de las explotaciones en España es de 150 kg/ha, mientras que en EE.UU. es de 2.500 kg/ha de almendra grano, debido al carácter intensivo de las plantaciones, altas densidades de plantación, riego y la utilización de variedades de gran rendimiento (Junta de Andalucía, 2016; Ollero-Lara *et al.*, 2016; López-Moral *et al.*, 2017). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, las nuevas plantaciones de almendro españolas están implantándose en sistemas de cultivo intensivo mejorando sustancialmente los rendimientos de cosecha.

1.2. Situación actual de las plantaciones de almendro en Andalucía

En Andalucía, el almendro ha estado asociado tradicionalmente a áreas de cultivo de secano, suponiendo el 95% de la superficie de almendro cultivada en esta comunidad autónoma (Junta de Andalucía, 2016). Sin embargo, en los últimos años, el cultivo del almendro está sufriendo una transición importante, pasando de zonas tradicionales a zonas de regadío con mejores condiciones, tanto edafoclimáticas como orográficas, lo que está repercutiendo en un aumento considerable del rendimiento de

las explotaciones (Arquero *et al.*, 2013). A su vez, estos cambios han propiciado una mayor incidencia de enfermedades consideradas secundarias o desconocidas para este cultivo en las zonas tradicionales (Ollero-Lara *et al.*, 2016).

En este sentido, la incidencia de las enfermedades foliares más comúnmente conocidas en el almendro como son la mancha ocre, el cribado, la moniliosis y la lepra causadas por los hongos *Polystigma amygdalinum*, *Thyrostroma carpophilum*, *Monilinia laxa* y *Taphrina deformans*, respectivamente, ha aumentado en los últimos años, describiéndose la mancha ocre y el cribado como las más prevalentes (Ollero-Lara *et al.*, 2016). Además, es importante destacar que en 2014 se detectó un grave ataque de antracnosis causada por especies del género *Colletotrichum* en las provincias de Huelva y Sevilla (López-Moral *et al.*, 2016; 2017).

1.2.1. Decaimiento de plantaciones jóvenes de almendro

Desde el verano de 2016, se viene observando una nueva problemática en plantaciones intensivas de almendros jóvenes asociada con decaimiento y muerte progresiva de los árboles en más de un 70% de las plantaciones de nuevo establecimiento en Andalucía, con especial incidencia en las provincias de Córdoba, Huelva y Sevilla. La intensificación del cultivo mediante el uso de grandes volúmenes de agua de riego e insumos (fertilizantes, fitosanitarios, etc.), unido a la entrada masiva de material vegetal con baja calidad fitosanitaria procedente de otros países para suplir la demanda de plantones, han podido contribuir considerablemente con la aparición de este síndrome.

1.2.1.1. Síntomas y posibles agentes causales asociados a la enfermedad

En general, en las plantaciones afectadas se observan árboles que desarrollan goma tanto en la zona de la cruz, como a lo largo del tronco y en la parte basal del tronco por encima del patrón. A medida que progresa la enfermedad, las hojas comienzan a marchitarse y las ramas a secarse, observándose un decaimiento progresivo de la planta que puede terminar con la muerte de la misma. Internamente, la madera muestra gran diversidad de síntomas, que van desde la decoloración y necrosis sectorial, hasta punteaduras negras que corresponden a vasos xilemáticos muertos (Fig. 1). Estos síntomas están claramente asociados a enfermedades de la madera, las cuáles han sido ampliamente estudiadas en vid (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach y Armengol, 2013; Carlucci *et al.*, 2015a; Agustí-Brisach *et al.*, 2017a; 2019) o en olivo

(Moral *et al.*, 2010; 2017; Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Carlucci *et al.*, 2013b; Agustí-Brisach *et al.*, 2017b). Sin embargo, en almendro es escasa la información que podemos encontrar sobre estas enfermedades en España. Hasta la fecha, los únicos estudios relacionados con el decaimiento de almendros se llevaron a cabo en plantaciones comerciales adultas en condiciones de semi abandono en las Islas Baleares entre 2008 y 2010 por Gramaje *et al.* (2012). Estos autores indican que el decaimiento del almendro podría estar asociado a hongos de las familias Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae y Diatrypaceae.

En este sentido, estudios recientes llevados a cabo en Andalucía por Antón-Domínguez (2019) en el que se realizaron prospecciones de campos de almendros con decaimiento, se identificaron las siguientes especies asociadas con este síndrome: i) Botryosphaeriaceae: *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Macrophomina phaseolina* y *Neofusicoccum parvum*; ii) Diaporthaceae: *Phomopsis amygdali*; iii) Diatrypaceae: *Eutypella microtheca*; iv) *Fusarium* spp.: *Fusarium oxysporum*; y v) colonias de crecimiento lento: *Phaeoacremonium krajdennii* y *Pleurostoma richardsiae*.

1.2.1.2. Biología y epidemiología

El ciclo biológico de los hongos causantes de las enfermedades de madera es fundamentalmente asexual y su dispersión es mediante conidios producidos por los cuerpos fructíferos del hongo (picnidios). Cuando las temperaturas son óptimas ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), éstos son liberados y se dispersan por la lluvia y el viento, o incluso a través de insectos vectores (Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Moral *et al.*, 2010, 2017; Agustí-Brisach *et al.*, 2015; 2017b). Así mismo, no se descarta que estos hongos puedan ser endófitos del almendro y desarrollarse en los tejidos como patógenos oportunistas en situaciones de estrés (sequía, helada, drenaje, etc.) (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2017b; Moral *et al.*, 2017).

La infección primaria se genera a partir de la penetración de conidios en tejidos dañados por las herramientas de poda (García-Jiménez *et al.*, 2010; Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Agustí-Brisach *et al.*, 2014; 2015; 2017b), recolección, daños de insectos, fenómenos meteorológicos, o heridas naturales. El material vegetal de partida también podría estar afectado por el patógeno, mostrando síntomas poco después de la plantación como consecuencia del estrés generado con el trasplante o la entrada en producción (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013a). Una vez colonizados los tejidos de la planta, los picnidios producen conidios que han sido

formados por el hongo bajo condiciones favorables de humedad y temperatura y que son los encargados de la infección secundaria (Michailides y Hasey, 2010) (Fig. 2).

1.2.1.3. Control

Actualmente no existen medidas de control eficaces que permitan controlar las enfermedades de la madera. Debido a la poca eficacia de los tratamientos fungicidas, las estrategias deben ir enfocadas a la prevención y al uso de prácticas culturales adecuadas. Por lo tanto, la prevención de las enfermedades de la madera parte de una buena elección del material vegetal de vivero. Estudios previos desarrollados por diversos autores principalmente en vid, demuestran que los hongos asociados a las enfermedades de la madera pueden estar presentes en el material de propagación siendo un medio importante de dispersión en las nuevas plantaciones (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013a). En este sentido, para el saneamiento del material de propagación de vid en vivero se han puesto a punto tratamientos por termoterapia con agua caliente, observándose que tratamientos a 53°C durante 30 min al material vegetal en estado latente pueden sanear la planta antes de salir de vivero sin que ésta pierda viabilidad (Gramaje, 2017). La utilización de agentes de biocontrol, como *Pythium oligandrum* y *Trichoderma atroviride*, ha resultado también efectiva para reducir la infección de los hongos de madera de vid en vivero (Gramaje, 2017). El uso de portainjertos y variedades resistentes es otra opción que está siendo actualmente de gran interés para un manejo integrado de estas enfermedades (Agustí-Brisach *et al.*, 2017a; Gramaje, 2017). Sin embargo, a día de hoy no existen estudios sobre la prevención de estas enfermedades en los viveros de propagación de almendro, y de cómo estas medidas preventivas empleadas en otros cultivos leñosos podrían adecuarse al almendro.

Por otro lado, una vez establecida la plantación, es importante la realización de un manejo adecuado del cultivo, haciendo hincapié en lo relativo al riego, la fertilización y la poda. Evitar las situaciones de estrés hídrico sin aportar riegos excesivos o deficientes, así como realizar una fertilización adecuada evitará el progreso de la enfermedad. Diversos autores han demostrado que las heridas realizadas durante la poda son una importante vía de acceso para los hongos de la madera (García-Jiménez *et al.*, 2010; Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Agustí-Brisach *et al.*, 2014; 2015; 2017b), y deben ser protegidas mediante el pintado con soluciones fungicidas, o bien mediante tratamientos fungicidas con materias activas de carácter protector y sistémico (materias

activas recomendadas: metil-tiofanato, tebuconazol, boscalida, mancozeb) (Bester *et al.*, 2007; Pitt *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2016; Olmo *et al.*, 2017b). Así mismo, los restos de poda generados son una importante fuente de inóculo de estos patógenos, por lo que deben ser destruidos tras la poda y retirados del campo (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b).



Figura 1. Síntomas de la enfermedad en almendros jóvenes en plantaciones intensivas en Andalucía. **a, b,** Síntomas de producción de goma en **(a)** la cruz, y en **(b)** el tronco; **c,** Marchitamiento y necrosis de hojas en almendros que empiezan a mostrar los primeros síntomas de la enfermedad; **d, e,** Decaimiento general y muerte progresiva de los árboles afectados; **f,** Decoloración interna de la madera ascendente desde la parte basal del patrón; **g,** Detalle del avance de la decoloración interna de la madera desde el posible punto de infección (rama) hasta el tronco; **h-i,** Síntomas internos en la madera típicos de hongos de madera, incluyendo necrosis sectoriales y punteaduras negras correspondientes a vasos xilemáticos muertos.

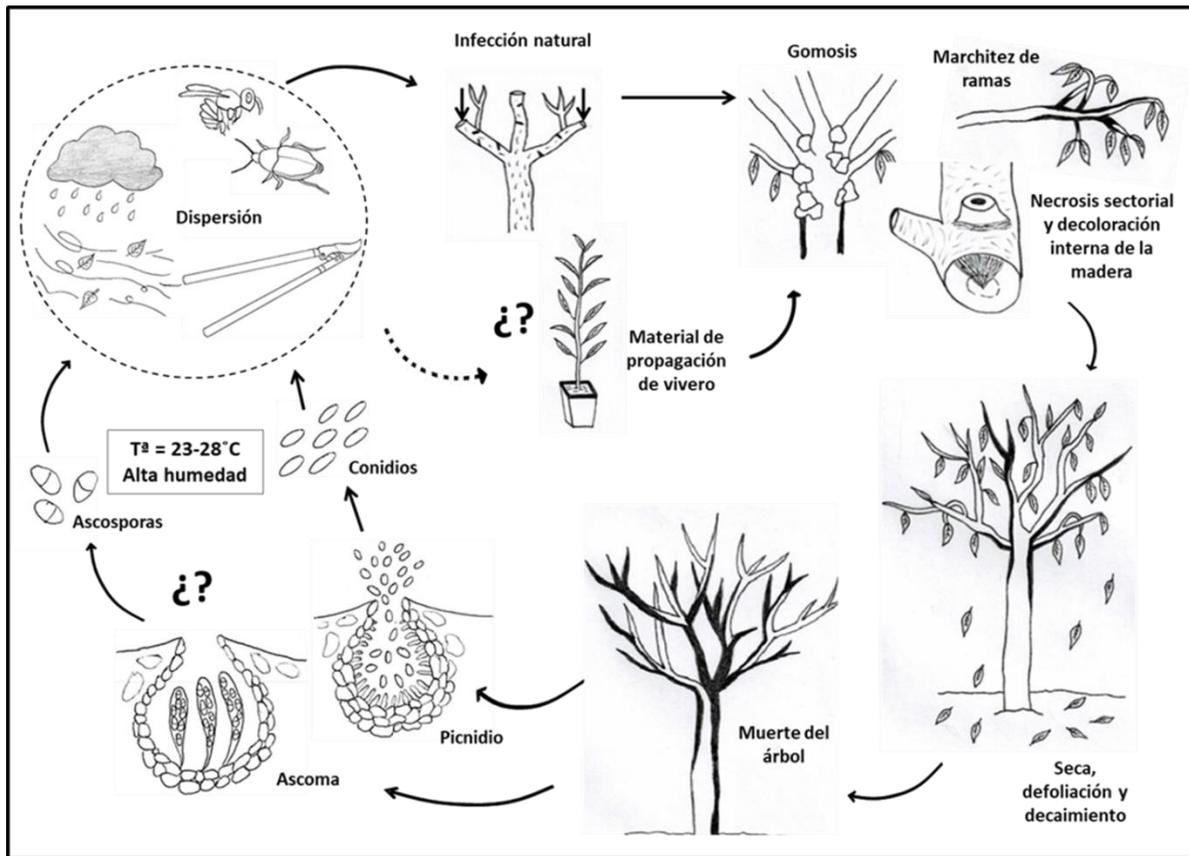


Figura 2. Ciclo de la enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El decaimiento del almendro provoca graves pérdidas de rendimiento de cosecha, y en ocasiones la muerte de las plantas. Este problema se ha venido observando en aumento desde verano de 2016 debido, entre otros factores, a la intensificación del almendro y su expansión desde zonas tradicionales a nuevas zonas con condiciones edafoclimáticas más favorables para el desarrollo del cultivo. En Andalucía, se han descrito las siguientes especies asociadas a este síndrome: *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Eutypella microtheca*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium krajdennii*, *Phomopsis amygdali* y *Pleurostoma richardsiae*. Sin embargo, su patogenicidad en almendro en las condiciones de cultivo de Andalucía no ha sido comprobada todavía. Por lo que el objetivo principal de este trabajo ha sido determinar el, o los principales agentes causales de esta compleja enfermedad mediante tests de patogenicidad. Para ello, se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la patogenicidad de todas las especies descritas anteriormente en rama cortada de almendro en condiciones de laboratorio.
- 2.- Evaluar la patogenicidad de todas las especies descritas anteriormente en ramas de almendro en condiciones de campo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislados fúngicos

En este estudio se seleccionaron un total de nueve aislados fúngicos representativos de las diferentes especies de hongos asociadas con síntomas de gomosis y decaimiento general del almendro en plantaciones jóvenes en Andalucía. Los aislados seleccionados fueron: *B. dothidea* ColPat-502, *D. iberica* Colpat-372, *E. microtheca* Colpat-494, *F. oxysporum* Colpat-548, *M. phaseolina* Colpat-490, *N. parvum* Colpat-497, *Pm. krajdinii* Colpat-520, *P. amygdali* Colpat-521 y *Pl. richardsiae* Colpat-550 (Tabla 1). Todos ellos han sido previamente caracterizados morfológica y molecularmente por Antón-Domínguez (2019), y se mantienen en la colección de hongos del Departamento de Agronomía de la ETSIAM, Universidad de Córdoba (UCO). Para la preparación del inóculo, los aislados se sacaron de colección y se sembraron en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA; Difco Laboratories®, Detroit) acidificado con ácido láctico [2,5 ml al 25% (vol/vol) por litro de medio] (APDA), y posteriormente se transfirieron a PDA. Todas las placas se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 14 días, y se revisaron diariamente.

3.2. Ensayos en rama cortada

3.2.1. Material vegetal.

Segmentos de ramas de almendro cv. Soleta de 1 año de edad y ≈ 25 cm de largo, se guardaron en bolsas y se llevaron al laboratorio. El material vegetal se obtuvo de un campo experimental de 10 años de edad perteneciente a la red de ensayos del IFAPA situado en Alameda del Obispo, Córdoba. Una vez en laboratorio, las ramas se limpiaron superficialmente con agua y Tween® 20 al 0,02%, posteriormente se sumergieron 1 min en etanol al 70% para su desinfección superficial, y seguidamente se sumergieron durante 1 min en agua para su aclarado. Las ramas se dejaron secar durante 30 min encima de la bancada sobre papel de filtro, y una vez secas se sellaron los extremos de las ramas con Parafilm®.

3.2.2. Inoculación e incubación

Para la inoculación de las ramas, se realizó una herida en la parte central de cada rama con un sacabocados de 7,5 mm de diámetro. En la herida, se depositó un disco de 7,5 mm de diámetro de PDA con micelio crecido como se describe anteriormente, poniendo en contacto el micelio con el tejido herido, y se selló con Parafilm®. Además,

se incluyeron ramas tratadas con herida y discos de PDA como control. Las ramas inoculadas y las ramas control se depositaron en cámaras húmedas (fiambreras de plástico, 32 × 25 × 8 cm) al 100 % de humedad relativa. Para ello, las fiambreras se rellenaron con sustrato de perlita estéril humidificado. Las cámaras húmedas se incubaron a 27±2°C en oscuridad durante 21 días.

3.2.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue en bloques al azar, siendo los aislados la variable independiente, las ramas las repeticiones y las cámaras húmedas los bloques. Se dispuso de tres cámaras húmedas (bloques), con cinco ramas (repeticiones) por cada uno de los 7 aislados o control. Se utilizaron un total de 15 ramas por aislado o control y 120 ramas en total.

3.3. Ensayos en rama en condiciones de campo

3.3.1. Material vegetal e inoculación

El material vegetal utilizado para los ensayos de campo fueron ramas de 1 año de edad de almendros cv. Soleta del campo experimental del IFAPA descrito anteriormente. Las ramas seleccionadas para la inoculación se marcaron previamente con cintas de colores, dándole un código de color diferente para cada aislado o control.

La inoculación se llevó a cabo el 21 de marzo de 2018. Antes de la inoculación, las ramas seleccionadas se desinfectaron superficialmente por pulverización con etanol al 70%, y frotando cuidadosamente con papel la zona de inoculación. La inoculación se realizó por el método de herida y deposición de disco de PDA con micelio como se ha descrito en el ensayo de rama cortada. Se incluyeron ramas tratadas con PDA sin inocular como control.

3.3.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue en bloques al azar, siendo los aislados la variable independiente, las ramas las repeticiones y los árboles los bloques. Se dispuso de cinco árboles (bloques), con dos ramas (repeticiones) tratadas en cada árbol por cada uno de los 7 aislados o control. De las dos ramas por árbol para cada aislado o control, una se seleccionó en la cara norte de la copa, y la otra en la cara sur. Se inocularon un total de 10 ramas por aislado o control, 80 ramas en total.

Tabla 1. Aislados fúngicos obtenidos de almendros afectadas por gomosis y decaimiento general en Andalucía utilizados en este estudio.

Familia, género/Especies	Aislados	Hospedante, variedad, patrón	Síntomas	Colector, Año	Origen	
Botryosphaeriaceae						
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Colpat-502	<i>Prunus dulcis</i> cv. Lauranne (Patrón GF-677).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Palma del Río, Córdoba, Andalucía, España
<i>Dothiorella iberica</i>	Colpat-372	<i>Prunus dulcis</i> cv. Guara (Patrón GF-677).	Seca de ramas, decaimiento general		C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Oria, Almería, Andalucía, España
<i>Macrophomina phaseolina</i> ^y	Colpat-490	<i>Prunus dulcis</i> cv. Vairo (Patrón Garnem).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Aldea Quintana, Córdoba, Andalucía, España
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Colpat-497	<i>Prunus dulcis</i> cv. Vairo (Patrón GF-677).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Palma del Río, Córdoba, Andalucía, España
Diaporthaceae						
<i>Phomopsis amygdali</i>	Colpat-521	<i>Prunus dulcis</i> cv. Guara (Patrón GF-677).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Alcalá del Río, Sevilla, Andalucía, España
Diatrypaceae						
<i>Eutypella microtheca</i>	Colpat-494	<i>Prunus dulcis</i> cv. Lauranne (Patrón Garnem)	Seca de ramas, decaimiento general		C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Écija, Sevilla, Andalucía, España
Nectriaceae						
<i>Fusarium oxysporum</i> ^y	Colpat-548	<i>Prunus dulcis</i> cv. Marta (Patrón Garnem).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Huelva, Andalucía, España
Togniniaceae						
<i>Phaeoacremonium krajdieni</i> ^z	Colpat-520	<i>Prunus dulcis</i> cv. Marta (Patrón Garnem).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Hornachuelos, Córdoba, Andalucía, España
Calosphaeriaceae						
<i>Pleurostoma richardsiae</i> ^z	Colpat-550	<i>Prunus dulcis</i> cv. Marta (Patrón Garnem).	Gomosis, general	decaimiento	C. Agustí- Trapero, 2017	Brisach y A. Huelva, Andalucía, España

^yAislados no incluidos en ensayo de campo.^zAislados no incluidos en ensayo de rama cortada.

3.4. Reaislamientos

Tanto en rama cortada como en campo, se llevaron a cabo reaislamientos seleccionando para ello, tres ramas por aislado o control. Los reaislamientos se realizaron del frente de avance de la lesión o de alrededor de la zona de la herida para las ramas inoculadas y las control, respectivamente; mientras que en las ramas inoculadas en campo, se realizaron tanto del frente de avance o de la zona de la herida; como de la madera asintomática situada a 2 cm del frente de avance o de la zona de la herida. Para ello, astillas de madera de las zonas indicadas se cortaron con ayuda de un bisturí estéril, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito sódico al 10% durante 1 min, y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril durante 15 min. Una vez secos, se sembraron en placas de APDA. Se sembraron dos placas de APDA por combinación de rama, aislado y/o punto de reaislamiento, con 7 puntos de aislamiento (astillas de madera) por placa. Las placas se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad entre 7 y 14 días hasta que se observó crecimiento de colonias en los puntos de aislamiento. Cuando las colonias tuvieron el crecimiento suficiente para poder ser identificadas morfológicamente, se calculó la frecuencia de aislamiento (%) para cada aislado.

3.5. Evaluaciones y análisis estadísticos

El ensayo de rama cortada se evaluó a las tres semanas tras la inoculación, y el ensayo en campo a los tres meses tras la inoculación. En ambos casos, se midió la longitud de lesión (mm) y el diámetro de la rama (mm). Así mismo, en el ensayo en campo, también se midió la profundidad de lesión (mm) en el punto de inoculación.

Para ambos ensayos, previamente a realizar el análisis estadístico de los datos, se comprobó la homogeneidad de varianzas, y la normalidad. Los controles se excluyeron del análisis estadístico ya que no mostraron lesiones. Para determinar la diferencia en virulencia entre los aislados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) siendo los aislados la variable independiente y la longitud de la lesión (mm) la variable dependiente. En ambos casos, la comparación de medias se realizó mediante el test HSD de Tukey ($P = 0,05$). Así mismo, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la longitud de lesión (mm) y el diámetro (mm) de las ramas para los grupos de aislados más virulentos en cada ensayo, rama cortada ($n = 7$) y campo ($n = 7$). Además, en el ensayo en campo se analizó la correlación entre la longitud de la lesión (mm) y la profundidad de la lesión (mm) en el punto de inoculación. Finalmente, se comprobó la correlación entre los datos de lesión (mm) del ensayo de rama cortada y

campo para los aislados comunes en ambos ensayos ($n = 5$). Los datos de este estudio se analizaron mediante el programa informático Statistix 10 (Analytical Software, 2013).

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos en rama cortada

Todos los aislados evaluados en el ensayo en rama cortada de almendro causaron lesiones necróticas en la madera (Fig. 3), aunque hubo diferencias significativas ($P < 0,0001$) en virulencia entre especies. Los aislados *B. dothidea* ColPat-502 y *N. parvum* ColPat-497 fueron los más virulentos mostrando una longitud de lesión de 144,8 y 131,6 mm, respectivamente. Así mismo, los aislados menos virulentos fueron *E. microtheca* Colpat-494 (Lesión = 34,0 mm) y *D. iberica* Colpat-372 (Lesión = 32,0 mm). Los aislados *M. phaseolina* Colpat-490, *P. amygdali* Colpat-521 y *F. oxysporum* Colpat-548 mostraron valores intermedios de virulencia (Fig. 5A).



Figura 3. Decoloración interna de la madera en rama cortada de almendro cv. Soleta a las 3 semanas tras la inoculación con discos de PDA con micelio (0, rama de control no inoculada) de los 7 aislados representativos seleccionados por su patogenicidad: (1) *Botryosphaeria dothidea* aislado ColPat-502, (2) *Neofusicoccum parvum* aislado ColPat-497, (3) *Macrophomina phaseolina* aislado ColPat-490, (4) *Phomopsis amygdali* aislado ColPat-521, (5) *Fusarium oxysporum* aislado ColPat-548, (6) *Eutypella microtheca* aislado ColPat-494, y (7) *Dothiorella iberica* aislado ColPat-372.

4.2. Ensayos en rama en condiciones de campo

Al igual que en la inoculación en rama cortada, los aislados evaluados en campo causaron lesiones necróticas en la madera y en ocasiones exudados de goma (Fig. 4). Se observaron diferencias significativas ($P > 0,0001$) en virulencia entre especies. En este

caso, el aislado *N. parvum* Colpat-497 fue el más virulento desarrollando una longitud de lesión de 244,2 mm, seguido de *P. amygdali* Colpat-521 (lesión = 110,3 mm). El resto de aislados mostraron lesiones marcadamente inferiores que variaron desde 16,0 hasta 23,7 mm para *D. iberica* Colpat-372 y *B. dothidea* ColPat-502, respectivamente (Fig. 5B).



Figura 4. Decoloración interna de la madera y seca de ramas de almendro cv. Soleta a los 3 meses tras la inoculación en campo con discos de PDA con micelio de los 7 aislados representativos seleccionados es este estudio: (A-B) *Neofusicoccum parvum* aislado ColPat-497, (C-D) *Phomopsis amygdali* aislado ColPat-521, (E) *Botryosphaeria dothidea* aislado ColPat-502, (F) *Eutypella microtheca* aislado ColPat-494, (G) *Pleurostoma richardsiae* aislado ColPat-550, (H) *Phaeoacremonium krajdienii* aislado ColPat-520, y (I) *Dothiorella iberica* aislado ColPat-372.

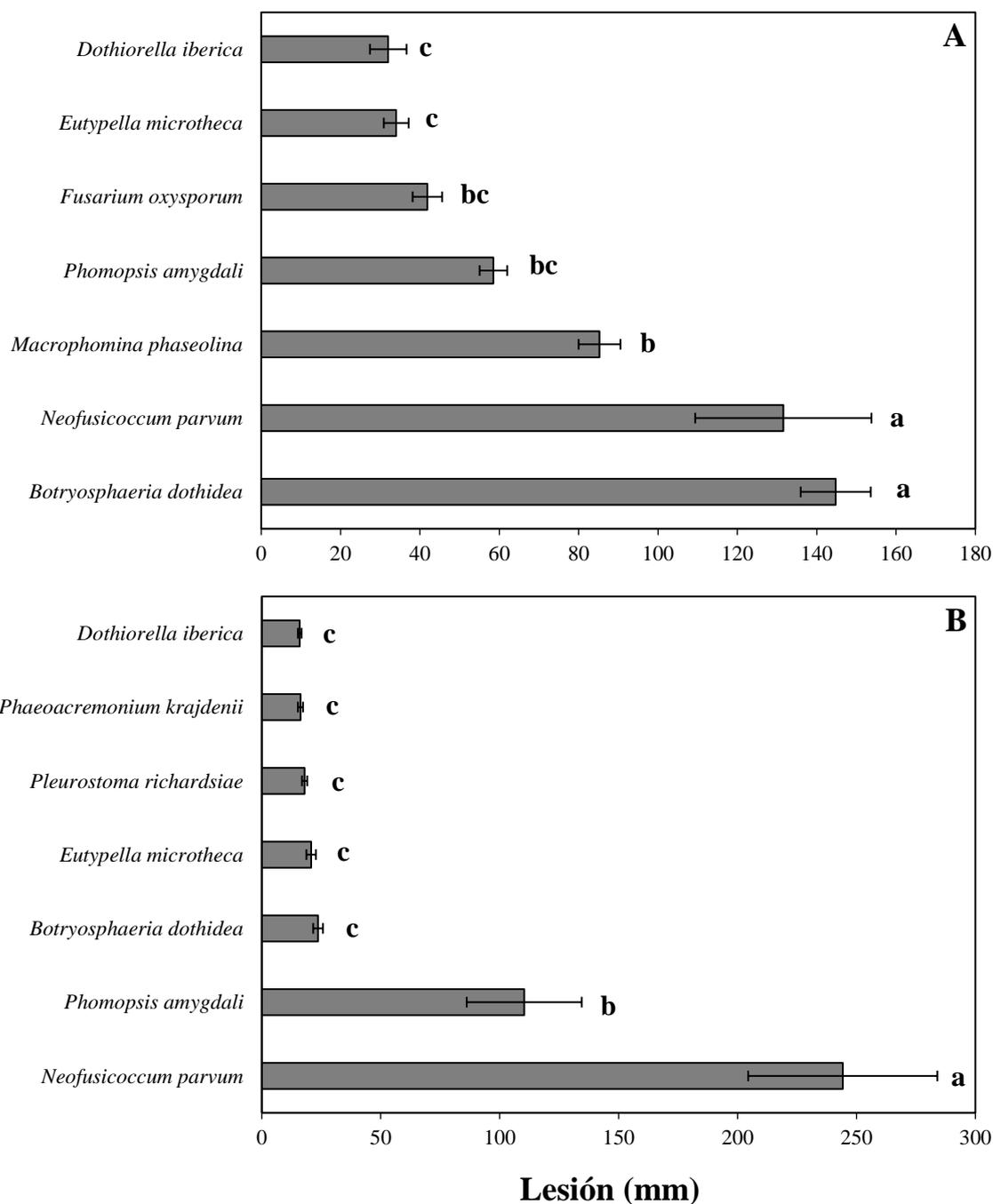


Figura 5. Severidad de la enfermedad (longitud de la lesión, mm) en las ramas cortadas **A**, y en campo **B**, de almendro cv. Soleta a las 3 semanas y 3 meses, respectivamente, después de la inoculación con discos de PDA con micelio de los aislados fúngicos seleccionados para cada experimento. Para cada aislado, las columnas representan la media de tres cámaras húmedas con cinco ramas cada una en las inoculaciones artificiales (**A**) y la media de cinco almendros con dos ramas inoculados cada uno en los experimentos de campo (**B**). En cada gráfico, las barras con letras comunes no difieren significativamente según el test HSD de Tukey ($P = 0,05$). Las líneas horizontales en las barras representan el error estándar de la media.

4.3. Correlaciones

Los análisis de correlación lineal mostraron que no hubo una correlación significativa entre la longitud de lesión (mm) y el diámetro de la rama (mm) tanto en el ensayo en rama cortada ($r = -0,2592$; $P = 0,5746$) como en campo ($r = -0,1829$; $P = 0,6946$). Sin embargo, se observó una correlación lineal positiva significativa ($r = 0,8629$; $P = 0,0124$) entre los datos de longitud de lesión (mm) y la profundidad de lesión (mm) en el punto de inoculación en el ensayo en campo para los siete aislados fúngicos analizados. Así mismo, tampoco hubo correlación significativa ($r = 0,4903$; $P = 0,4017$) entre los datos de longitud de lesión (mm) del ensayo de rama cortada y campo para los aislados comunes de ambos ensayos.

4.4. Reaislamientos

Los hongos fueron reaislados y la morfología fue igual que la del hongo inoculado, cumpliendo con los postulados de Koch. La frecuencia de reaislamiento varió de unos aislados a otros. En el caso del ensayo en rama cortada la frecuencia de reaislamiento varió entre 71,0 y 100%, y en el de campo entre 76,0 y 100%. No se aislaron hongos fitopatógenos de las ramas control. Así mismo, la frecuencia en los reaislamientos realizados 2 cm más allá del margen de la lesión necrótica para el ensayo en campo fue de 0,0% en la mayoría de los casos, salvo para *E. microtheca* Colpat-494 y *Pm. kraidenii* Colpat-520, con una frecuencia de reaislamiento de 31,0 y 7,0%, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de reisolamiento (%) de los aislados fúngicos utilizados en las pruebas de patogenicidad realizadas en este estudio.

Familia, género/Especies	Aislados	Frecuencia de reisolamiento (%) ^x		
		Rama cortada	Campo	
		Margen de lesión necrótica	Margen de lesión necrótica	2-cm más allá del margen de la lesión necrótica
Botryosphaeriaceae				
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Colpat-502	100,0	100,0	0,0
<i>Dothiorella iberica</i>	Colpat-372	90,0	76,0	0,0
<i>Macrophomina phaseolina</i> ^y	Colpat-490	95,0	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Colpat-497	100,0	76,0	0,0
Diaporthaceae				
<i>Phomopsis amygdali</i>	Colpat-521	71,0	83,0	0,0
Diatrypaceae				
<i>Eutypella microtheca</i>	Colpat-494	98,0	100,0	31,0
Nectriaceae				
<i>Fusarium oxysporum</i> ^y	Colpat-548	83,0	-	-
Togniniaceae				
<i>Phaeoacremonium krajdenui</i> ^z	Colpat-520	-	76,0	7,0
Calosphaeriaceae				
<i>Pleurostoma richardsiae</i> ^z	Colpat-550	-	76,0	0,0
Control	PDA	0,0	0,0	0,0

^xSe realizaron reisolamientos a partir de tres ramas por aislado o control. Se sembraron dos placas de APDA por combinación de rama, aislado y/o punto de reisolamiento, con 7 puntos de aislamiento (astillas de madera) por placa. El porcentaje de aislamiento se calculó como [(n° de puntos inoculados positivos/n° del total de puntos inoculados) × 100].

^yAislados no incluidos en ensayo de campo.

^zAislados no incluidos en ensayo de rama cortada.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, el cultivo del almendro ha cobrado gran importancia en España debido al buen mercado de la almendra implantándose en sistemas intensivos de regadío con condiciones agronómicas y ambientales favorables para su desarrollo. A su vez, estas mejores condiciones han favorecido también el aumento de la incidencia de enfermedades en este cultivo. En este sentido, desde el verano de 2016, se viene observando una nueva problemática en las nuevas plantaciones intensivas de almendro en Andalucía asociada con gomosis, marchitez, decaimiento general y muerte progresiva de los árboles. Internamente, la madera mostraba decoloración, necrosis sectoriales y pequeñas punteaduras negras correspondientes a vasos xilemáticos muertos. Según los síntomas descritos, estamos ante una compleja enfermedad que podría estar asociada a numerosos agentes causales relacionados con las enfermedades de la madera.

Sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre estas enfermedades en almendro. Concretamente, las enfermedades de madera de este cultivo solo han sido estudiadas en California (Inderbitzin *et al.*, 2010) y en plantaciones comerciales adultas en las Islas Baleares (Gramaje, *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2015, 2016, 2017a) donde se describen hongos de la familia Botryosphaeriaceae y de los géneros *Collophora*, *Eutypa*, *Phaeoacremonium*, *Phomopsis* o *Pleurostomophora*. No obstante, a día de hoy, solo existe un estudio realizado en almendros jóvenes de plantaciones intensivas en Andalucía por Antón-Domínguez (2019), donde se prospectaron plantaciones afectadas en las provincias de Córdoba, Almería, Huelva y Sevilla. De las muestras de madera analizadas en este estudio se identificaron las siguientes especies: i) Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *D. iberica*, *M. phaseolina* y *N. parvum*), ii) Diaporthaceae (*P. amygdali*), iii) Diatrypaceae (*E. microtheca*), iv) *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*) y v) colonias de crecimiento lento (*Pm. krajdennii* y *Pl. richardsiae*).

Con el objetivo de determinar cuál o cuáles de estas especies descritas podrían ser los agentes causales de este síndrome en Andalucía, el objetivo principal de este trabajo fue demostrar la patogenicidad de todas ellas en almendro, tanto en rama cortada como en ramas en campo. Los aislados *Pm. krajdennii* ColPat-520 y *Pl. richardsiae* Colpat-550 se excluyeron del ensayo en rama cortada debido a su carácter vascular. Por otra parte, la exclusión de los aislados *F. oxysporum* Colpat-548 y *M. phaseolina* Colpat-490 del ensayo en campo se debió a que se trata de hongos poco frecuentes en la

parte aérea del árbol, además de su conocido carácter saprofito, por lo que se está realizando un estudio específico para cada una de estas dos especies.

Las especies *B. dothidea* y *N. parvum* fueron las más virulentas en el ensayo de rama cortada, y *N. parvum* la más virulenta en el ensayo en campo. Tanto *B. dothidea* (English *et al.*, 1966, 1975; Inderbitzin *et al.*, 2010; Gramaje *et al.*, 2012) como *N. parvum* (Inderbitzin *et al.*, 2010; Gramaje *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2016, 2017a), han sido descritas previamente asociadas al decaimiento del almendro tanto en España como en otros países productores de almendra. Es importante destacar que *N. parvum* fue la segunda especie más virulenta después de *N. nonquaesitum* en el estudio de Inderbitzin *et al.* (2010), en el que se inocularon ramas de almendros con aislados de *B. dothidea*, *Diplodia seriata*, *D. sarmentorum*, *M. phaseolina*, *N. mediterraneum*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum*. Sin embargo, en ese mismo estudio, *B. dothidea* fue el quinto aislado más virulento, lo cual no coincide con nuestro estudio. En el ensayo en campo, el segundo aislado más virulento fue *P. amygdali*, siendo ligeramente superior a la del estudio de Varjas *et al.* (2017). Para los dos ensayos, la especie menos virulenta fue *D. iberica*, coincidiendo con el estudio de Doll *et al.* (2015). Nuestros resultados apuntan a que, en general, las especies de la familia Botryosphaeriaceae, podrían considerarse como uno de los principales agentes causales de la enfermedad, principalmente *N. parvum*; mientras que el resto de especies podrían estar actuando como endófitos u oportunistas. Si bien es cierto, no está claro el papel que juegan todos estos hongos en la infección y desarrollo de enfermedades en plantas leñosas, y por lo tanto, si se pueden considerar como patógenos primarios o deben ser considerados endófitos que muestran síntomas solo cuando se provocan condiciones de estrés (infección previa por otro patógeno, déficit o exceso de riego, fertilización inadecuada, susceptibilidad varietal, etc.) (Hofstetter *et al.*, 2012; Bertsch *et al.*, 2012). Esto nos indica que estamos ante una compleja enfermedad, en la que la virulencia del patógeno puede estar muy ligada a factores bióticos y abióticos del entorno. Finalmente, la no correlación significativa entre el ensayo de rama cortada y campo ($r = 0,4903$; $P = 0,4017$) podría ser debida fundamentalmente al marcado carácter saprofito de algunas especies como *B. dothidea* que son mucho más virulentas en tejido muerto que en planta viva.

Por otra parte, el cultivo del almendro coexiste en esta área geográfica con otros cultivos leñosos de gran interés, como son el olivo (*Olea europaea* L.) o la vid (*Vitis vinifera* L.), que son también susceptibles a los hongos de madera (Moral *et al.*, 2010, 2017; Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Agustí-Brisach *et al.*, 2015, 2019). El olivo es el

cultivo leñoso más importante a nivel nacional, con un 65% de superficie en la región de Andalucía (Moral *et al.*, 2017) y la vid es un cultivo con un gran impacto socio-económico que cuenta con unas 34.300 ha cultivadas en Andalucía (Agustí-Brisach *et al.*, 2019). Estos dos cultivos se ven afectados principalmente, al igual que en el caso del almendro, por especies de la familia Botryosphaeriaceae, entre otros hongos de madera (Van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Moral *et al.*, 2017). Esto hace que continuar dilucidando la biología y epidemiología de esta enfermedad de la madera del almendro en Andalucía teniendo en cuenta factores bióticos y abióticos del entorno, sea la base para establecer medidas de control eficaces para prevenir la infección de estos hongos no solo en almendro, sino también en olivo y vid.

Es importante destacar que en California (EE.UU.) se han descrito síntomas de decoloración de la madera y decaimiento de almendros similares a los encontrados en Andalucía y en particular afectando a los cultivares más vigorosos como ‘Nonpareil’. Este síndrome fue denominado con el nombre de ‘Band Canker’ identificándose *B. dothidea* como principal agente causal (Teviotdale *et al.*, 2002). Por otro lado, estos mismos autores describen un síndrome que consiste en la presencia de goma asociada a un posterior decaimiento y muerte progresiva del almendro, conocido como ‘Foamy Canker’. A pesar de los estudios realizados hasta el momento, no se ha logrado identificar al agente causal de esta enfermedad, y aunque se asocia a bacterias (*Zymomonas* spp.), actualmente se clasifica como un desorden de causas desconocidas. Así mismo, se ha demostrado que existe relación entre los síntomas asociados a decaimiento de árboles por hongos de la madera y a los descritos para *Xylella fastidiosa* en cultivos leñosos como el olivo o el almendro, ya que algunos autores han aislado la bacteria conjuntamente con hongos de la madera a partir de muestras que mostraban decoloración y marchitez vascular (Krugner *et al.*, 2012, 2014; Carlucci *et al.*, 2013a, 2013b, 2015b; Almeida y Nunney, 2015; D’Onghia *et al.*, 2017; Moralejo y Belbahri, 2017). A pesar de que *X. fastidiosa* todavía no ha sido identificada en almendros de Andalucía, es importante tenerla en cuenta en el diagnóstico debido a los antecedentes de esta enfermedad en las Islas Baleares y Alicante.

A pesar de los estudios previos sobre enfermedades de la madera, a día de hoy, éstas continúan siendo enfermedades de etiología compleja, por lo que, no se pueden dar recomendaciones específicas de control. En este sentido, es necesario seguir investigando sobre la etiología, biología y epidemiología de esta enfermedad emergente

del almendro en Andalucía para dilucidar los principales agentes causales y poder así establecer las bases para un manejo integrado de la enfermedad. No obstante, es importante indicar que la elección de material vegetal de calidad y con buen estado fitosanitario, y el cuidado en las prácticas culturales como la poda y el manejo agronómico de la plantación son fundamentales para su prevención.

6. CONCLUSIONES

1.- Las especies *B. dothidea* y *N. parvum* resultaron las más virulentas en el ensayo de laboratorio en rama cortada. El resto de especies mostraron diferencias de virulencia entre ellas, siendo *E. microtheca* y *D. iberica* las menos virulentas.

2.- Las especies *N. parvum* y *P. amygdali* resultaron las más virulentas en el ensayo en campo, siendo *N. parvum* significativamente más virulento que *P. amygdali*. El resto de especies no desarrollaron lesiones importantes en las ramas en relación con el control sin inocular.

3.- Los análisis de correlación lineal demostraron que existe correlación positiva entre los datos de longitud de lesión (mm) y la profundidad de lesión (mm) en el punto de inoculación en el ensayo en campo. Por otro lado, no hubo correlación significativa entre la longitud de lesión (mm) y el diámetro de la rama (mm), ni entre las longitudes de lesión (mm) de los dos ensayos.

4.- Las especies de la familia Botryosphaeriaceae, podrían considerarse como uno de los principales agentes causales de la enfermedad, principalmente *N. parvum*; mientras que el resto de especies podrían estar actuando como endófitos u oportunistas. Esto nos indica que estamos ante una compleja enfermedad, en la que la virulencia del patógeno podría estar muy ligada a factores bióticos y abióticos del entorno.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí-Brisach, C., Armengol, J., 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and control measures. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 245-261.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2013a. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 137: 103-112.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, G., Armengol, J., García-Jiménez, J., 2013b. Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. *Tierras* 202: 108-113.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2014. Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control. *Phytoma España* 260: 26-30.
- Agustí-Brisach, C., León, M., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2015. Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. *Plant Disease* 99: 976-981.
- Agustí-Brisach, C., Franco, R., López-Moral, A., Raya-Ortega, M. C., Roca, L. F., Trapero, A., 2017a. Enfermedades de la madera de la vid. *Vida Rural* 432: 30-38.
- Agustí-Brisach, C., Moral, J., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., Raya-Ortega, M. C., Romero, J., Trapero A., 2017b. Etiología y perspectivas de control de los chancros y desecaciones de ramas de olivo causados por hongos. *Phytoma España* 292: 54-60.
- Agustí-Brisach, C., López-Moral, A., Raya-Ortega, M. C., Franco, R., Roca, L. F., Trapero, A., 2019. Occurrence of grapevine trunk diseases affecting the native cultivar Pedro Ximénez in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 153: 599-625.
- Almeida, R. P. P., Nunney, L., 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? *Plant Disease* 99: 1457-1467.
- Analytical Software, 2013. Statistix 10. User's manual. Tallahassee, FL, USA.
- Antón-Domínguez, B. I., 2019. Caracterización fenotípica y molecular de los hongos asociados al decaimiento del almendro en plantaciones jóvenes en Andalucía. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Córdoba, España.

- Arquero, O., Belmonte, A., Casado, B., Cruz-Blanco, M., Espadafor, M., Fernández, J. L., Gallego, J. C., García, A., Lorite, I., Lovera, M., Parra, M. A., Ramírez, A., Roca, L., Romancho, F. J., Romero, J., Salguero, A., Santos, C., Serrano, N., Trapero, A., Urquiza, F., Viñas, M., 2013. Manual del almendro. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Ediciones Junta de Andalucía, Sevilla, España, 80 pp.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., Fontaine, F., 2012. Grapevine trunk disease: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62: 243-265.
- Bester, W., Crous, P. W., Fourie, P. H., 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36: 73-77.
- Carlucci, A., Lops, F., Marchi, G., Mugnai, L., Surico, G., 2013a. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin? *Phytopathologia Mediterranea* 52: 541-544.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Cibelli, F., Phillips, A. J. L., Lops, F., 2013b. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 517-527.
- Carlucci, A., Cibelli, F., Lops, F., Phillips, A. J. L., Ciccarone, C., Raimondo, M. L., 2015a. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 109-123.
- Carlucci, A., Lops, F., Cibelli, F., Raimondo, M. L., 2015b. *Phaeoacremonium* species associated with olive wilt & decline in southern Italy. *European Journal of Plant Pathology* 141: 717-729.
- Doll, D. A., Rolshausen, P. E., Pouzoulet, J., Michailides, T. J., 2015. First report of *Dothiorella iberica* causing trunk and scaffold cankers of almond in California. *Plant Disease* 99: 1185.
- D'Onghia, A. M., Brunel, S., Valentini, F., 2017. *Xylella fastidiosa* & the Olive Quick Decline Syndrome (OQDS). A serious worldwide challenge for the safeguard of olive trees. CIHEAM, Bari, Italy, 172 p.
- English, H., Davis, J. R., DeVay, J. E., 1966. *Dothiorella* canker, a new disease of almond trees in California. *Phytopathology* 56: 146.

- English, H., Davis J. R., DeVay J. E., 1975. Relationship of *Botryosphaeria dothidea* and *Hendersonula toruloidea* to a canker disease of almond. *Phytopathology* 65: 114-122.
- Fan, K., Wang, J., Fu, L., Li, X., Zhang, Y., Zhang, X., Zhai H., Qu, J., 2016. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole in China. *Crop Protection* 87: 1-5.
- FAO, 2017. <http://www.fao.org>. (Consulta: 08/06/2019).
- García-Jiménez J., Raposo R., Armengol J., 2010. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Pgs.161-173 en: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí, eds. Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado. SEF-Phytoma España. Valencia.
- Gramaje, D., Armengol, J., 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: Potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040-1055.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., Armengol, J., 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28: 1-13.
- Gramaje, D., 2017. Manejo de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid en viveros y nuevas plantaciones. *Phytoma España* 274: 83-85.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K., 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* 54: 51-67.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Trouillas, F. P., Michailides, T. J., 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia* 102: 1350-1368.
- Junta de Andalucía, 2016. Caracterización del sector de la almendra en Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescajdesarrollorural.html>
- Krugner, R., Ledbetter, C. A., Chen, J., Shrestha, A., 2012. Phenology of *Xylella fastidiosa* and its vector around California almond nurseries: an assessment of plant vulnerability to almond leaf scorch disease. *Plant Disease* 96: 1488-1494.
- Krugner, R., Sisterson, M. S., Chen, J., Stenger, D. C., Johnson, M. W., 2014. Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Disease* 98: 1186-1193.

- López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., Raya, M. C., Lovera, M., Roca, L. F., Luque, F., Arquero, O., Trapero, A., 2016. La antracnosis del almendro, susceptibilidad varietal en Andalucía: sintomatología, agente causal, ciclo biológico y métodos de control de la enfermedad. *Vida Rural* 423: 56-62.
- López-Moral, A., Raya-Ortega, M. C., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F., Lovera, M., Luque, F., Arquero, O., Trapero, A., 2017. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing almond anthracnose in Spain. *Plant Disease* 101: 2034-2045.
- Lovera, M., Serrano, N., Arquero, O., 2016. El cultivo del almendro en Andalucía. *Horticultura*, especial 2016: 30-37.
- MAPA, 2017. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (Consulta: 08/06/2019).
- Michailides, T. J., Hasey, J., 2010. *Botryosphaeria* and *Phomopsis* cankers of walnuts in California. Walnut husk fly field meeting. University of California cooperative extension, CA.
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., Michailides, T. J., 2010. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100: 1340-1351.
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Pérez Rodríguez, M., Xavier, C., Raya, M. C., Rhouma, A., Trapero, A., 2017. Identification of fungal species associated with branch dieback of olive and resistance of table cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 101: 306-316.
- Moralejo, E., Belbahri, L., 2017. *Xylella fastidiosa* associated with extensive mortality of almond trees in Mallorca. European Conference on *Xylella*, Book of Abstracts, pp 41-42.
- Ollero-Lara, A., López-Moral, A., Lovera, M., Raya, M. C., Roca, L. F., Arquero, O., Trapero, A., 2016. Las enfermedades del almendro en Andalucía. *Fruticultura* 49: 166-183.
- Olmo, D., Armengol, J., León, M., Gramaje, D., 2015. Pathogenicity testing of lesser-known fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees. *European Journal of Plant Pathology* 143: 607-611.

- Olmo, D., Armengol, J., León, M., Gramaje, D., 2016. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from almond trees on the Island of Mallorca (Spain). *Plant Disease* 100: 2483-2491.
- Olmo, D., Gramaje, D., Armengol, J., 2017a. Hongos asociados a las enfermedades de la madera del almendro en la Isla de Mallorca. *Fruticultura* 54: 18-29.
- Olmo, D., Gramaje, D., Armengol, J., 2017b. Evaluation of fungicides to protect pruning wounds from Botryosphaeriaceae species infections on almond trees. *Phytopathologia Mediterranea* 56: 77-86.
- Pitt, W. M., Sosnowski, M. R., Huang, R., Qiu, Y., Steel, C. C., Savocchia, S., 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease* 96: 1303-1308.
- Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W., 2002. Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones. APS Press, Saint Paul, MN, USA.
- Úrbez-Torres, J. R., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S5-S45.
- Úrbez-Torres, J. R., Bruez, E., Hurtado, J., Gluber, W. D., 2010. Effect of temperature on conidial germination of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Plant Disease* 97: 231-244.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., Gubler, W. D., 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease* 97: 231-244.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., Halleen, F., 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.
- Varjas, V., Vajna, L., Izsépi, F., Nagy, G., Pájtli, É., 2017. First report of *Phomopsis amygdali* causing twig canker on almond in Hungary. *Plant Disease* 101: 1674.

8. ANEJO ESTADÍSTICO

1. Patogenicidad en rama cortada

1.1. Comprobación de la homogeneidad de varianzas

Completely Randomized AOV for Long

Source	DF	SS	MS	F	P
Aislado	6	39221.8	6536.97	23.24	0.0000
Error	14	3938.7	281.34		
Total	20	43160.5			

Grand Mean 75.446 CV 22.23

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.52	0.0244
O'Brien's Test	1.57	0.2288
Brown and Forsythe Test	1.41	0.2776

1.2. ANOVA por bloques al azar

Randomized Complete Block AOV Table for Long

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	2	975.0	487.51		
Aislado	6	39221.8	6536.97	26.47	0.0000
Error	12	2963.7	246.97		
Total	20	43160.5			

Grand Mean 75.446
CV 20.83

1.3. Test de comparación de medias

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Long for Aislado

Aislado	Mean	Homogeneous Groups
ColPat-502	144.80	A
ColPat-497	131.60	A
ColPat-490	85.27	B
ColPat-521	58.53	BC
ColPat-548	41.88	BC
ColPat-494	34.03	C
ColPat-372	32.02	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 12.832
Critical Q Value 4.943 Critical Value for Comparison 44.853
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

2. Patogenicidad en campo

2.1. Comprobación de la homogeneidad de varianzas

Completely Randomized AOV for Long

Source	DF	SS	MS	F	P
Aislado	6	224152	37358.6	24.04	0.0000
Error	28	43509	1553.9		
Total	34	267660			

Grand Mean 64.172 CV 61.43

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.16	0.0781
O'Brien's Test	1.58	0.1889
Brown and Forsythe Test	2.41	0.0527

2.2. ANOVA por bloques al azar

Randomized Complete Block AOV Table for Long

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	4	5198	1299.5		
Aislado	6	224152	37358.6	23.40	0.0000
Error	24	38311	1596.3		
Total	34	267660			

Grand Mean 64.172
CV 62.26

2.3. Test de comparación de medias

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Long for Aislado

Aislado	Mean	Homogeneous Groups
ColPat-497	244.24	A
ColPat-521	110.32	B
ColPat-502	23.67	C
ColPat-494	20.76	C
ColPat-550	17.99	C
ColPat-520	16.27	C
ColPat-372	15.96	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 25.269
Critical Q Value 4.542 Critical Value for Comparison 81.147
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

3. Análisis estadístico de las correlaciones

3.1. Correlaciones longitud-diámetro en rama cortada

Correlations (Pearson)

	Longitud	Diametro
Longitud	1,0000	
p-value	0,0000	
Diametro	-0,2592	1,0000
	0,5746	0,0000

Cases Included 7 Missing Cases 0

3.2. Correlaciones longitud-diámetro en campo

Correlations (Pearson)

	Longitud	Diametro
Longitud	1,0000	
p-value	0,0000	
Diametro	-0,1829	1,0000
	0,6946	0,0000

Cases Included 7 Missing Cases 0

3.3. Correlaciones longitud-profundidad en campo

Correlations (Pearson)

	Longitud	Profundid
Longitud	1,0000	
p-value	0,0000	
Profundid	0,8629	1,0000
	0,0124	0,0000

Cases Included 7 Missing Cases 0

3.4. Correlaciones longitud rama cortada-longitud campo

Correlations (Pearson)

	LongitudR	LongitudC
LongitudR	1,0000	
p-value	0,0000	
LongitudC	0,4903	1,0000
	0,4017	0,0000

Cases Included 5 Missing Cases 0