



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

“Control biológico in vitro de hongos patógenos de madera de vid mediante el uso de aceites esenciales”.

Alumno: Rodrigo Mirasierra Velardo

Tutor: Fernando Manuel Alves Santos

Directora: Laura Martín Blanco

Julio 2021

Agradecimientos:

A la Universidad de Valladolid, al departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales y al profesor Manuel García Zumel (colaborador honorífico), ahora jubilado, por permitirme usar el laboratorio de Fitopatología.

Al Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera.

A Josefina Vila cresco por plantar la semilla.

A Fernando Manuel Alves Santos por hacer que germinase.

A Laura Martín Blanco por regarla.

A mis padres Ángeles y Rodrigo.

A Ana y mis hermanos Irene y Ángel.

A toda mi familia, que desde antes de que yo llegase cuidaban la tierra y elaboraban vino con sus frutos.

A todos los amigos que desde cerca o desde lejos me acompañan en el camino.

Índice	
Índice de figuras	5
MEMORIA.....	9
Resumen/Summary.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Enfermedades de madera	10
1.2 Sintomatología externa de las EMV.....	10
1.3 Sintomatología interna de las EMV.....	10
1.4 Etiología de las EMV.....	11
1.5 Origen de los aceites esenciales.....	11
1.6 Caracterización de los aceites esenciales.....	12
2 OBJETIVO DEL ESTUDIO.....	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Los hongos patógenos <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> y <i>Neofusicoccum parvum</i>	15
3.2 Obtención de los aislados	15
3.3 Los aceites esenciales.....	16
3.4 Análisis del crecimiento de los hongos en placa de PDA	16
3.5 Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 Ensayos <i>in vitro</i> crecimiento en medio PDA + aceite esencial	18
4.2 Crecimiento de los hongos en placa de Petri.....	18
4.2.1 <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56) vs. aceites esenciales.....	18
4.2.2 <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> (PCH-33) vs. aceites esenciales.....	27
4.2.3 <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> (BV-287) vs aceites esenciales	36
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFÍA	50

Índice de tablas

Tabla 1: Relación entre los aceites esenciales utilizados y las principales materias activas presentes en ellos. Proveniente de las respectivas casas comerciales.....	13
Tabla 2: Identificación en los proyectos RTA2015-0015-C02-2 (financiado por el INIA y la AEI) e IB18102 (financiado por el PRI de Extremadura).....	16
Tabla 3: Origen comercial y especies de los diferentes aceites esenciales utilizados en el proyecto.	16
Tabla 4: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de abeto, a los 14 días.	19
Tabla 5: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de cedro, a los 14 días.	21
Tabla 6: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de pino, a los 14 días.	22
Tabla 7: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de canela, a los 14 días.	24
Tabla 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de citronela, a los 14 días.	25
Tabla 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), con aceite esencial de clavo, a los 14 días.	27
Tabla 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), con aceite esencial de abeto, a los 26 días.	28
Tabla 11: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), con aceite esencial de cedro, a los 26 días.	30
Tabla 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), con aceite esencial de pino, a los 26 días.	31
Tabla 13: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33) con aceite esencial de canela, a los 22 días.	33
Tabla 14: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33) con aceite esencial de citronela, a los 22 días.	34
Tabla 15: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33) con aceite esencial de clavo (CLA), a los 22 días.	35
Tabla 16: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de abeto, a los 26 días.	37
Tabla 17: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de cedro (CED), a los 26 días.	39

Alumno/a: Rodrigo Mirasierra Velardo

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Grado en Enología

Tabla 18: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de pino, a los 26 días.....	40
Tabla 19: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de canela, a los 22 días.	41
Tabla 20: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de citronela, a los 22 días.	43
Tabla 21: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) con aceite esencial de clavo, a los 22 días.	44
Tabla 22: Disminución del crecimiento para los 30 primeros días de los hongos patógenos estudiados; <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) y <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), frente a los AE.	45
Tabla 23: Disminución del crecimiento para los 60 primeros días de los hongos patógenos estudiados; <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) y <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), frente a los AE.	45
Tabla 24: Tabla elaborada con datos provenientes de estudios anteriores (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016), inhibiciones de los hongos <i>Alternaria</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Penicillium</i> obtenidas a las 4 semanas.	46
Tabla 25: Inhibición total del crecimiento para los 30 primeros días de los hongos patógenos estudiados; <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) y <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), frente a los AE.	47
Tabla 26: Inhibición total del crecimiento para los 60 primeros días de los hongos patógenos estudiados; <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (PCH-33), <i>Phaemoniella chlamydospora</i> (BV-287) y <i>Neofusicoccum parvum</i> (BV-56), frente a los AE.	48
Tabla 27: Tabla elaborada con datos provenientes de estudios anteriores (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016), inhibiciones totales de los hongos <i>Alternaria</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Penicillium</i> obtenidas a las 4 semanas.	48

Índice de figuras

Figura 1: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	18
Figura 2: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).	19
Figura 3: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	20

Figura 4: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	20
Figura 5: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	21
Figura 6: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con pino (PIN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	22
Figura 7: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	23
Figura 8: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con canela (CAN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	23
Figura 9: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	24
Figura 10: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	25
Figura 11: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	26
Figura 12: Crecimiento de <i>Neofusicoccum parvum</i> BV-56 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	26
Figura 13: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	27
Figura 14: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	28
Figura 15: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	29
Figura 16: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	29

Figura 17: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	30
Figura 18: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con pino (PIN) a los 30 y 60 días. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	31
Figura 19: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	31
Figura 20: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con canela (CAN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	32
Figura 21: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	33
Figura 22: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	34
Figura 23: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33, en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	34
Figura 24: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> PCH-33 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	35
Figura 25: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	36
Figura 26: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	37
Figura 27: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	38
Figura 28: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	38
Figura 29: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	39

Figura 30: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con pino (PIN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	40
Figura 31: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	41
Figura 32: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con canela (CAN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	41
Figura 33: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	42
Figura 34: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	42
Figura 35: Evolución, en días, del crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287, en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.	43
Figura 36: Crecimiento de <i>Phaemoniella chlamydospora</i> BV-287 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p>0,05$).	43

MEMORIA

Resumen/Summary

Resumen

Una de las grandes preocupaciones para el cultivo de la vid, las enfermedades de madera de vid (EMV), como el decaimiento por *Botryosphaeriaceae*, la yesca, la eutipiosis o la enfermedad de Petri, son producidas por un complejo de hongos fitopatógenos, y provocan síntomas adversos hasta la muerte prematura de la planta. El control biológico o biocontrol es uno de los pilares fundamentales del manejo integrado de plagas y enfermedades. Dentro de este calificativo se encuentran tanto el uso y empleo de organismos vivos o productos naturales derivados de estos. En el presente estudio se pretende hacer una primera aproximación de la eficiencia de distintos aceites esenciales en el control *in vitro* de estos patógenos. En este trabajo, se postulan, con el objetivo de encontrar un posible tratamiento, diferentes concentraciones de aceites esenciales producidos por las plantas de, canela, citronela, clavo, pino, cedro y abeto, frente a diferentes hongos patógenos de la vid, como son; *Phaemoniella clamidospora* y *Neofusicoccum parvum*.

Summary

One of the great concerns for grapevine cultivation, the wood decay diseases, such as decay by *Botryosphaeriaceae*, esca, eutipiosis or Petri disease, are produced by a complex of phytopathogenic fungi, and cause adverse symptoms up to premature plant death. Biological control or biocontrol is one of the fundamental pillars of integrated pest and disease management. Within this term are included the use of living organisms or the natural products derived from them. The present study aims to make a first approach of the efficiency of different essential oils in the *in vitro* control of these pathogens. In this work, with the aim of finding a possible treatment, different concentrations of essential oils produced by cinnamon, citronella, cloves, pine, cedar and fir, are postulated against different pathogenic fungi of the grapevine, such as *Phaemoniella chlamydospora* and *Neofusicoccum parvum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades de madera

Las EMV (Enfermedades de la Madera de la Vid) son un conjunto de complejas patologías causadas por más de 100 especies de hongos (Gramaje et al., 2018). Las sintomatologías propias de las EMV son la yesca, la eutipiosis, el decaimiento por *Botryosphaeriaceae* y la excoriosis en viñedos adultos y las enfermedades de Petri y pie negro en plantaciones jóvenes (Bertsch et al., 2013; Gramaje et al., 2018; Martín & Martín, 2013a). En todos los casos, los hongos infectan la madera y como consecuencia se produce un decaimiento progresivo de la vid, que reduce significativamente la producción de uva. Finalmente, las vides mueren, obligando a reponer el viñedo afectado.

Todas las áreas de cultivo del mundo sufren las EMV (Fontaine et al., 2016) y su impacto económico crece de forma alarmante (Bertsch et al., 2009; Bruez et al., 2013; Gramaje et al., 2018). Diversos estudios han cuantificado el coste asociado a las EMV: 1,132 M € anuales, mundiales por replantación (Hofstetter et al., 2012). 2.800 \$ por ha o 260 millones de \$ anuales por pérdidas debidas a eutipiosis en Australia y California, respectivamente, (Fontaine et al., 2016; Gramaje et al., 2018). Es importante destacar que no se conocen materias activas con acción curativa, capaces de erradicar los patógenos del interior de la madera.

En España se estima que el 2-3% de los viñedos tienen EMV, con afectación de más del 20% de las cepas en algunas parcelas (COST ACTION 017/13). Estudios desarrollados en Castilla y León han descrito la presencia de EMV en el 50% de parcelas muestreadas y un incremento alarmante de la incidencia (1,8% en 2003 - 10,5% en 2007) (Cobos, 2008; Martín & Martín, 2013a; Rubio & Garzón, 2011).

1.2 Sintomatología externa de las EMV.

La yesca puede reconocerse externamente por el desarrollo de decoloraciones internerviales típicas en las hojas, conocidas como “*hoja de tigre*”. La producción se reduce por pasificación de los racimos. Existe una forma rápida de la enfermedad, que consiste en un marchitamiento brusco e irreversible de la planta conocido como apoplejía (Mugnai et al., 1999). En eutipiosis los síntomas externos se corresponden con pámpanos débiles y entrenudos cortos con hojas pequeñas y cloróticas, y racimos abortados (Legorburu et al., 2014). En el decaimiento por *Botryosphaeriaceae* se observa una progresiva desecación y muerte de los brazos (Legorburu et al., 2014; Úrbez-Torres, 2011). En plantaciones jóvenes las vides afectadas por pie negro y enfermedad de Petri, muestran un retraso en la brotación y el desarrollo, con hojas pequeñas y cloróticas (Gramaje et al., 2018).

1.3 Sintomatología interna de las EMV.

Numerosos estudios han demostrado que los síntomas de la parte vegetativa pueden aparecer durante un ciclo vegetativo y no manifestarse en años posteriores (Romanazzi et al., 2009; Sosnowski et al., 2007). Los hongos patógenos se desarrollan internamente causando una necrosis y/o podredumbre de la madera. Estas lesiones internas de la madera se hacen perceptibles al realizar cortes transversales, obligando a destruir parte de la planta para realizar un diagnóstico adecuado y aislar los hongos patógenos. En el caso de la yesca se observa una degradación progresiva de la madera con zonas necrosadas de color oscuro y una podredumbre esponjosa en el centro (Mugnai et al., 1999). En las enfermedades de eutipiosis y decaimiento por *Botryosphaeriaceae* la

Alumno/a: Rodrigo Mirasierra Velardo

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Grado en Enología

necrosis de la madera sigue una distribución sectorial muy característica (Legorburu et al., 2014; Úrbez-Torres, 2011). En planta joven, los síntomas internos de pie negro afectan a la raíz, con reducción de la biomasa radicular y necrosis severas de la madera en la zona de inserción de las raíces (Agustí-Brisach & Armengol., 2013). En la enfermedad de Petri la madera infectada presenta punteaduras de coloración oscura alrededor de la médula, a veces con exudaciones gomosas (Gramaje et al., 2018; Mostert et al., 2006).

1.4 Etiología de las EMV.

En los últimos 20 años son numerosos los estudios de etiología, orientados al aislamiento e identificación de los agentes causales de las EMV. La yesca está causada principalmente por los hongos Ascomicetos *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams y *Phaeoacremonium* spp. y los Basidiomicetos del género *Fomitiporia*, responsable de la madera blanca y esponjosa (Bertsch et al., 2013). La eutipiosis está causada por más de 24 especies entre las que destaca el Ascomiceto *Eutypa lata* y otros hongos Diatripaceos (Gramaje et al., 2018; Luque et al., 2012). El decaimiento por *Botryosphaeria* está causado por más de 26 especies de la familia *Botryosphaeriaceae*, pertenecientes a los géneros *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryosphaeria*, y *Spencermartinsia* (Gramaje et al., 2018; Pitt et al., 2013; Úrbez-Torres, 2011; Yang et al., 2017). Los agentes causales de la enfermedad de Petri, incluyen Pch, 29 especies de *Phaeoacremonium*, *Pleurostoma richardsiae* y seis especies de *Cadophora* spp. (Gramaje et al., 2018; Travadon et al., 2015). La enfermedad del pie negro está causada por especies pertenecientes a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, y *Thelonectria*, *Neonectria* (Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Cabral et al., 2012; Lombard et al., 2014).

En España se conoce la presencia de múltiples especies fúngicas asociadas a EMV: en Castilla y León (Martín et al., 2011; Martín et al., 2012; Martín & Martín, 2013a; Martín et al., 2009; Martín, Martín, Cuesta, et al., 2011; Martín & Cobos, 2007); Cataluña (Luque et al., 2009; Luque et al., 2012), y otras comunidades como Valencia, Castilla La Mancha, Madrid, País Vasco o Galicia (Armengol et al., 2001; Aroca et al., 2010; Gramaje et al., 2009; Legorburu et al., 2014; Martín, Martín, Cuesta, et al., 2011; Pintos-Varela et al., 2017; Tello et al., 2010). Las especies mayoritariamente aisladas en plantas con EMV son Pch, *Phaeoacremonium minimum*, *F. mediterranea*, *E. lata*, *Cryptovalsa ampelina*, *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, slippers & A.J.L. Philips; *Cadophora luteo-olivacea*; *I. liriodendri* y el complejo *D. macrodidyma* (Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Armengol et al., 2001; Aroca et al., 2006; Aroca et al., 2010; Gramaje et al., 2009; Gramaje & Armengol, 2011; Luque et al., 2009; Luque, 2006; Luque et al., 2012; Martín, 2017; Martín & Martín, 2013b; Martín & Cobos, 2007; Pintos-Varela et al., 2017)

1.5 Origen de los aceites esenciales.

Las plantas sintetizan compuestos como respuesta al ataque de diferentes organismos, desde saliva de herbívoros a entrar en contacto con microorganismos como hongos (Biere et al., 2004), también al estar en contacto con factores abióticos como el estrés hídrico, fuertes rachas de viento o congelación (Ward, 1986). Estos compuestos forman parte del grupo de los metabolitos secundarios, de las plantas. Procedentes del metabolismo primario y esencial de éstas para continuar vivas, dando como resultado un nuevo sistema de síntesis de compuestos no esenciales para la vida de la planta,

pero como en el caso que nos ocupa generan “defensas” a los diferentes ataques. Conformando parte del “sistema inmunitario” de las plantas, que libera compuestos fitotóxicos al ambiente u organismo agresor, actuando como un agente disuasorio.

Los aceites esenciales provienen de diferentes partes de las plantas como las flores (clavo), Hojas (abeto, citronela, canela, pino), tallos (citronela), corteza (canela) y madera (cedro) (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Según el método elegido para la separación de los aceites esenciales determinará la calidad final del producto. Para la obtención de estos aceites esenciales fundamentalmente (93% de la producción de aceites esenciales totales (Masango, 2005)) se utilizan dos métodos de destilación en presencia de agua: destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación. En el primero el material vegetal se encuentra en el paso del vapor de agua y en el segundo el material vegetal está en contacto directo con el agua. La destilación por arrastre de vapor es una técnica de extracción muy utilizada para separar aceites esenciales sin perder compuestos polares en las aguas residuales del proceso. El material vegetal se dispone encima del agua, por donde sólo pasa vapor de agua arrastrando los compuestos para la obtención del aceite. La hidrodestilación se ha convertido en el principal método para la extracción de aceites esenciales provenientes de madera o flores, sumergiendo la materia vegetal en agua y llevando a ebullición. El proceso ayuda a encapsular los aceites protegiéndolos de las altas temperaturas, obteniendo mayor cantidad de compuestos volátiles y menos oxidaciones. Todo el proceso puede tener lugar a temperaturas menores de 100 °C. (Tongnuanchan & Benjakul, 2014)

De otras plantas, generalmente de sus frutos o de su cáscara, se extraen los aceites por presión, como por ejemplo, los aceites esenciales provenientes de los cítricos.

También existen otros métodos para la extracción de aceites con disolventes orgánicos, como metanol, etanol, acetona, hexano o éter; implementado para obtener aceites esenciales de material floral delicado o frágil por ejemplo rosas. Mayormente utilizado en perfumería, con alto coste y tiempo (Li *et al.*, 2009; Tongnuanchan & Benjakul, 2014). La extracción con fluidos supercríticos, normalmente CO₂, para obtener altas extracciones de aceite esencial en cortos periodos de tiempo (Hawthorne *et al.*, 1993; Jiménez-Carmona *et al.*, 1999). En el que a altas presiones el CO₂ pasa a estado líquido, en presencia del material vegetal los aceites se solubilizan y al volver a un estado de presión normalizado el CO₂ pasa a estado gaseoso obteniendo el aceite esencial (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Encontramos métodos unidos a la destilación como la extracción por microondas o pretratamientos con ultrasonidos al realizar la destilación (Peredo *et al.*, 2009; Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Los compuestos de los aceites esenciales tienden a ser bastante volátiles, incluso en presencia de gases inertes, también se degradan en presencia de luz, oxígeno u altas temperaturas (Turek & Stintzing, 2013) por lo que se deben almacenar resguardados, en lugares sin luz, cambios de temperatura, cerrados y en frascos de vidrio de topacio.

1.6 Caracterización de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) definidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO); “Producto obtenido a partir de materia vegetal, ya sea por destilación con agua o vapor, o desde el epicarpio de los cítricos mediante un proceso mecánico, o por destilación seca” (ISO 9235,1997). Todos de naturaleza física para no

Alumno/a: Rodrigo Mirasierra Velardo

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Grado en Enología

alterar las propiedades de los compuestos aromáticos, no grasos, volátiles y ligeros (masa molecular 100-200 g·mol⁻¹).

Históricamente, los aceites esenciales, se han utilizado desde la antigüedad muy vinculados a la religión para realizar embalsamamientos y realizar perfumes en Egipto, difíciles de caracterizar debido a la naturaleza volátil de éstos (Łucejko et al., 2017).

En la Edad Media se produjo un redescubrimiento, desde oriente, de los aceites esenciales utilizados para la limpieza y la medicina. Desde entonces se han utilizado ampliamente para diferentes aplicaciones bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitarias, insecticidas, medicinales y cosméticas en la actualidad se usan especialmente en la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y alimentaria (Bakkali et al., 2008).

Los aceites esenciales son mezclas complejas con múltiples componentes con acción biológica. En muchos casos existen variaciones en la composición provocadas por factores ambientales o por las distintas variedades de plantas que se usan en su obtención, incluso por el método de extracción y las condiciones de éste. Dando lugar a una mezcla compleja de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles. Sin embargo, podemos destacar algunos de los componentes más importantes que están presentes en los aceites usados en este trabajo (Tabla 1).

Aceite esencial	Materia activa
Citronela	Citronelal Geraniol Acetato de geraniol
Abeto	Acetato de bornilo
Canela	Cinamaldehído Eugenol
Clavo	Eugenol
Cedro	α -cedreno Cedrol Thujopseno
Pino	α -pineno β -pineno Δ^3 -careno

Tabla 1: Relación entre los aceites esenciales utilizados y las principales materias activas presentes en ellos. Proveniente de las respectivas casas comerciales.

Los hongos son mucho más sensibles a la mayoría de los aceites esenciales que las bacterias. Entre los compuestos más efectivos se encuentran el geraniol, acetato de geraniol, cinamaldehído y eugenol (Van de Vel et al., 2019). En el presente proyecto se han probado tres aceites usados en investigaciones desde 1995 hasta la actualidad, estos aceites son canela, citronela y clavo. En contraposición se han usado aceites forestales abeto, cedro y pino muy poco estudiados a lo largo de los años, bastante exóticos en este campo. Por ejemplo, con el AE de cedro no aparece en la revisión de Van de Vel (1995-2016) en el que sí aparecen los AE de clavo (eugenol) y pino (careno, pineno).

2 OBJETIVO DEL ESTUDIO

- Evaluar *in vitro* la capacidad de inhibición de crecimiento de patógenos en mediante los productos naturales (aceites esenciales).
- Comparar la eficiencia de los distintos aceites frente a cada patógeno.
- Estimar las dosis que resultan efectivas tanto en la reducción del crecimiento como en la inhibición total.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Los hongos patógenos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Neofusicoccum parvum*

Para este trabajo se han seleccionado los patógenos *Phaeomoniella chlamydospora* (agente causal de la enfermedad de Petri y la yesca) (Mugnai et al., 1999; Romanazzi et al., 2009) y *Neofusicoccum parvum* (agente causal del decaimiento por Botryosphaeriaceae). Dentro de la familia Botryosphaeriaceae, la especie *Neofusicoccum parvum* resulta una de las más virulentas (Pedro et al., n.d.; Pitt et al., 2013; José Ramón Úrbez-Torres, 2011). La identificación a nivel de especie y la virulencia de los aislados utilizados ha sido previamente contrastada, en los trabajos de los proyectos RTA2015-0015-C02-2 (financiado por el INIA y la AEI) e IB18102 (financiado por el PRI de Extremadura).

Los tres aislados utilizados fueron proporcionados por la Dra. Martín Blanco (CICYTEX), dos de *Phaeomoniella chlamydospora* (BV-287 y PCH-33) y uno de *Neofusicoccum parvum* (BV-56).

En concreto, los aislados BV-287, PCH-33, de la especie *Phaeomoniella chlamydospora* han sido aislados a partir de plantas con síntomas de yesca en La Rioja y Extremadura, respectivamente. Para la identificación molecular se ha seguido la descripción propuesta por Crous y Gams (Crous & Gams, 2000). A nivel molecular se ha realizado una extracción de ADN, y una PCR específica utilizando los primers Pch1 y Pch2 (Tegli, 2000), siguiendo el protocolo descrito en Cobos y Martín 2007. Adicionalmente se ha secuenciado la región ITS, amplificada con los oligos ITS4 e ITS5 (White et al., 1990), y la secuencia ha sido sometida a un análisis BLASTN en la base de datos del NCBI.

En el caso de la especie *Neofusicoccum parvum*, el aislado utilizado proviene de La Rioja y ha sido identificado por criterios morfológicos (Phillips et al., 2013) y molecularmente mediante extracción de ADN y una PCR utilizando los oligos ITS1 y NL4 (White et al., 1990), seguido de una digestión enzimática de acuerdo con lo descrito en (Alves et al., 2005; María Teresa Martín & Cobos, 2007). Adicionalmente se ha secuenciado la región del Factor de Elongación amplificada con los oligos EFE1 728F y EFE1 986R (Carbone & Kohn, 1999), y la secuencia ha sido sometida a un análisis BLASTN en la base de datos del NCBI.

3.2 Obtención de los aislados

En el trabajo se han utilizado dos especies fúngicas (Tabla 2) *Phaeomoniella chlamydospora* (dos cepas (BV-287, PCH-33)) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), aportadas por la Dra. Martín Blanco, provenientes de la investigación en curso del Área de protección vegetal del Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura.

Los aislados proceden de un cultivo puro. Obteniendo 3 placas de cada uno de los hongos sembrando un cubo de agar en el centro de cada una de las placas (*Neofusicoccum parvum*; BV-56, *Phaeomoniella chlamydospora*; BV-287 y PCH-33) en medio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubado en oscuridad a 25 °C. El medio contiene 39 g de PDA en un litro de agua destilada, agitándose hasta su total disolución y

esterilizándose en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Se reparte en placas de Petri estériles de 85 mm de diámetro en cabina de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR).

Aislado	Origen
<i>Phaeoconiella chlamydospora BV-287</i>	La Rioja
<i>Phaeoconiella chlamydospora PCH-33</i>	Extremadura
<i>Neofusicoccum parvum BV-56</i>	La Rioja

Tabla 2: Identificación en los proyectos RTA2015-0015-C02-2 (financiado por el INIA y la AEI) e IB18102 (financiado por el PRI de Extremadura).

3.3 Los aceites esenciales.

Los aceites esenciales utilizados para la realización del trabajo son de origen comercial, provenientes de herbolario (Tabla 3); canela, citronela, clavo, abeto, cedro, pino.

Los aceites se obtienen por destilación de vapor de las diferentes partes de la planta separando las diferentes fases.

Aceite esencial	Casa comercial	Especie
Citronela	Manuel Riesgo S.L.	<i>Cymbopogon winterlanus</i>
Abeto	Aromatika	<i>Abies sibirica</i>
Canela	Amapola cosmetics	<i>Cinnamomum verum</i>
Clavo	Marnys aromatherapy world	<i>Syzygium aromaticum</i>
Cedro	Mystic moments	<i>Cedrus deodara</i>
Pino	Aromatika	<i>Pinus sylvestris</i>

Tabla 3: Origen comercial y especies de los diferentes aceites esenciales utilizados en el proyecto.

3.4 Análisis del crecimiento de los hongos en placa de PDA

El ensayo de control biológico se ha llevado a cabo para evaluar el crecimiento micelial in vitro de los hongos en placa de Petri con medio de cultivo PDA.

Los aceites han sido preparados teniendo en cuenta su insolubilidad en agua, por tanto, se han preparado diluciones en alcohol (etanol absoluto). Tomamos 1 mL de aceite esencial, añadimos 9 mL de etanol para obtener una mezcla del 10%, de aquí tomamos 1 ml y lo disolvemos en 9 ml de etanol, llegando a un 1% y se repite el proceso para obtener 0,1%, por tanto:

T3000: 9 mL al 10%/300 mL = 9mL a 100000 ppm/300 mL = 3000 ppm

T300: 9 mL al 1%/300 mL = 9mL a 10000 ppm/300 mL = 300 ppm

T30: 9 mL al 0.1%/300 mL = 9mL a 1000 ppm/300 mL = 30 ppm

T0: 9 mL de alcohol en 300 mL

Alumno/a: Rodrigo Mirasierra Velardo

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Grado en Enología

En la preparación del medio PDA antes de que solidifique aproximadamente a unos 50°C añadimos la dilución de aceite esencial correspondiente y se distribuyen entre 25-30 mL del medio en placas de Petri de 85 mm de diámetro.

El total de placas utilizadas son: 6 aceites esenciales (abeto, cedro, pino, canela, citronela, clavo) x 4 tratamientos (T0, T30, T300, T3000) x 3 patógenos x 3 repeticiones = 216 placas de Petri.

De las placas replicadas del cultivo original se fue obteniendo, con un bisturí, en cabina de flujo, una porción de unos 5x5x5 mm de agar unido al micelio de cada hongo, colocándolo en el centro de cada una de las nuevas placas y marcando el punto central con un rotulador.

Para obtener lecturas desde el punto central se marcan dos ejes perpendiculares con ayuda de una regla y se mide periódicamente durante las semanas posteriores el crecimiento del micelio del hongo en mm. Llegando hasta unas 8 semanas y media. El tamaño máximo de colonización en la placa de Petri es de 5675 mm² que asimilamos al 100% de la superficie del medio en placa.

Con mediciones periódicas de ambos ejes se obtiene una media de ambos diámetros y calculando su superficie en mm² con la fórmula [1] siguiente:

$$\text{Superficie} = \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times \pi \quad [1]$$

Para la obtención del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se utiliza la fórmula [2]. Por recomendación de la Dra. Martín Blanco, se realiza la medición a los 14 días para *Neofusicoccum parvum* (M. T. Martín, Martín, & Cuesta, 2011) y para *Phaemoniella chlamydospora* a las 3 semanas (M. T. Martín, Martín, & Cuesta, 2011), al no haber tomado las mediciones los mismos días, se tomarán para los grupos de abeto, cedro, pino a los 26 días y para el grupo canela, citronela, clavo a los 22 días. Ya que el crecimiento de *Neofusicoccum parvum* es mucho más rápido que el de *Phaemoniella chlamydospora*

$$\text{PICR} = \frac{(\text{Radio}\bar{x} \text{ Control} - \text{Radio}\bar{x} \text{ Tratamiento})}{\text{Radio}\bar{x} \text{ Control}} \times 100 \quad [2]$$

El resultado de PICR nunca va a llegar a 100% ya que el radio se va a calcular a partir del trozo de micelio, por tanto se obtendrán porcentajes máximos de 97-98%

3.5 Análisis estadístico

El análisis preliminar con el test de Levene indicaba que no existía igualdad de varianzas y por tanto los contrastes deben realizarse con pruebas no paramétricas. Los análisis estadísticos se realizaron con test no paramétricos: test de Kruskal-Wallis para la evaluación de las variables a estudiar y test U de Mann-Whitney para las comparaciones por pares posteriores cuando el test de Kruskal-Wallis indicaba diferencias estadísticamente significativas. El software utilizado para el análisis fue STATISTICA v.9 y la descriptiva y gráficas fueron construidas con el software habitual de Microsoft.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos *in vitro* crecimiento en medio PDA + aceite esencial

Como ya se ha descrito anteriormente los aceites se administran en tres tratamientos 30, 300 y 3000 ppm (T30, T300 y T3000 respectivamente), además de un control (T0), todos ellos por triplicado para cada uno de los patógenos.

Los datos obtenidos se expresan a través de diagramas de barras (Anexo) también en el cuerpo del texto a través de diagramas de dispersión de puntos unidos por líneas rectas y diagramas de barras, representando el comportamiento de cada patógeno dependiendo de los diferentes escenarios propuestos.

Se explican en cada uno de los emparejamiento los resultados obtenidos. Por un lado, se observa la evolución del crecimiento y se hace la comparación estadística con los datos de la medición de un mes donde se aprecia que se estabilizan.

Cada uno de los gráficos es acompañado por un texto explicativo para adaptarse a los objetivos propuestos.

4.2 Crecimiento de los hongos en placa de Petri

4.2.1 *Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. aceites esenciales.

***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. abeto**

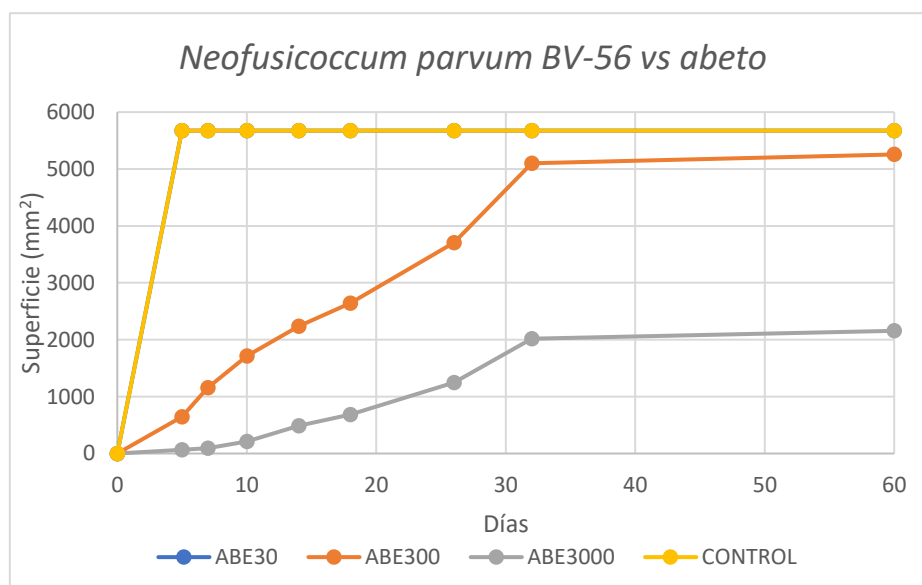


Figura 1: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la figura anterior (Figura 1) podemos observar como el AE ejerce una disminución en el crecimiento a altas concentraciones, (3000 ppm). Aunque durante los 30 primeros días el tratamiento de 300 ppm parece que retrasa el crecimiento del patógeno. El efecto se va perdiendo. El efecto de la dosis de 30 ppm no se diferencia del control.

En la segunda mitad del primer mes (unas tres semanas) se observa un repunte en el crecimiento del hongo probablemente debido a la volatilización de los compuestos activos del aceite esencial.

En la siguiente figura (Figura2a) siguiente se puede observar el resultado estadístico tras un mes de crecimiento. El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 8,295380$; con una probabilidad de $p = 0,0403$). Da como resultado que si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). En la figura 2 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

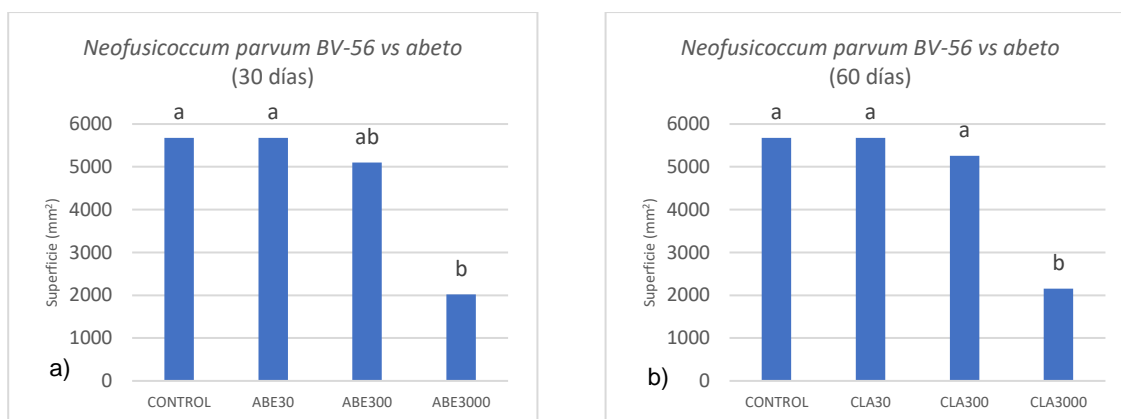


Figura 2: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

En la Figura 2 podemos observar cómo en el tratamiento 300 ppm se percibe un cambio en el crecimiento. Aunque en el tratamiento de 3000 ppm encontramos un descenso más acusado y estadísticamente significativo en el crecimiento.

Existe una ligera reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 ppm y notable para el tratamiento de 3000 ppm (Tabla 4) aunque sólo es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 3000 ppm (Figura 2) y no llega a una inhibición completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	37,3
3000	71,4

Tabla 4: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de abeto, a los 14 días.

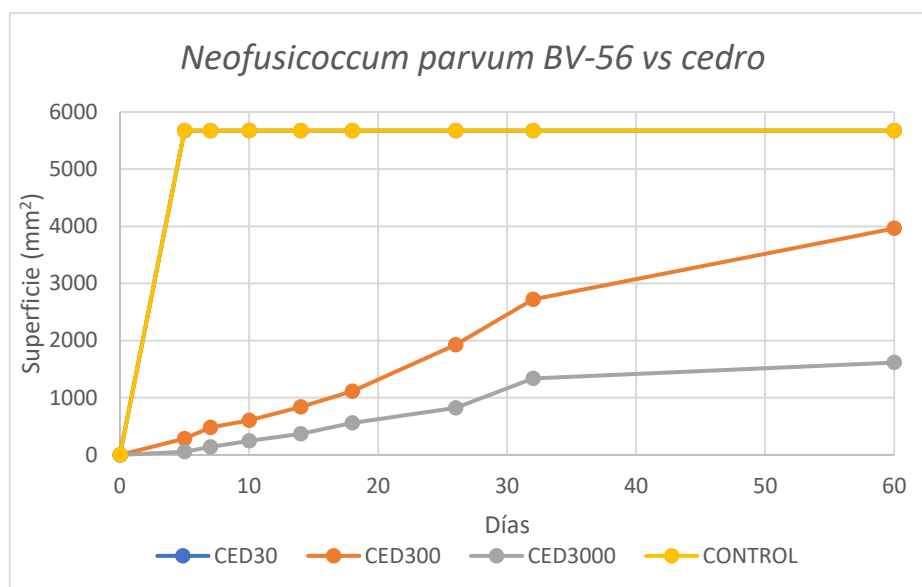
***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. cedro**

Figura 3: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En este caso (Figura 3) nos encontramos con un escenario parecido al anterior, pero con la diferencia en que los dos tratamientos con más concentración (300 ppm y 3000 ppm) parecen ejercer un mayor efecto en el crecimiento del patógeno. En referencia al tratamiento de 30 ppm sigue siendo muy insuficiente con un comportamiento igual al control.

Como ya se ha visto anteriormente finalizando el primer mes (unas cuatro semanas) el aceite pierde efectividad contra el hongo.

El test de Kruskal Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 8,295380$, con una probabilidad de $p = 0,0403$). Muestra diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). En la Figura 2 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

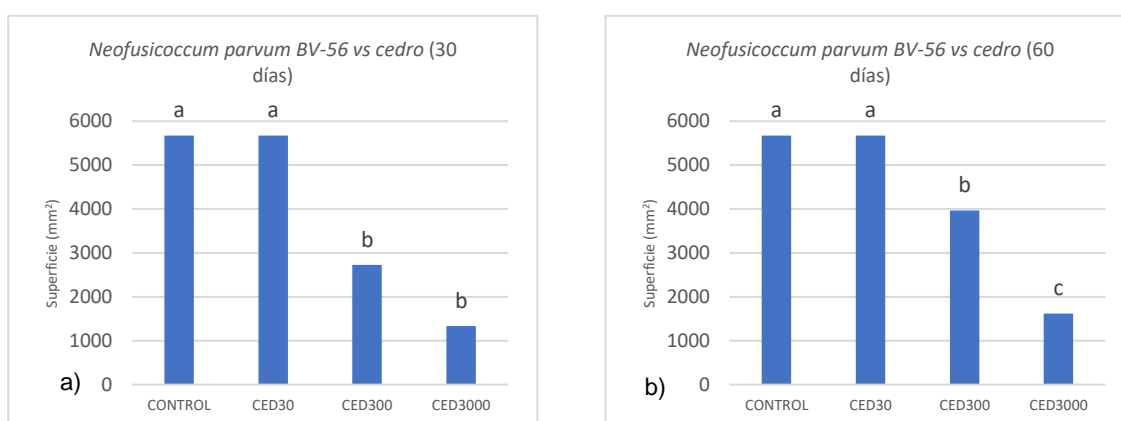


Figura 4: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

A través de la figura anterior (Figura 4) se observan realmente diferencias significativas entre los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm del de 30 ppm, aunque ninguno inhibe el crecimiento, de forma total, del patógeno. Realmente en el estudio se buscan concentraciones que inhiban el crecimiento de los patógenos y en este caso parece que la concentración de 300 ppm puede ser efectiva para este caso.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	61,6
3000	74,5

Tabla 5: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de cedro, a los 14 días.

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 ppm y 3000 ppm (Tabla 5) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 4) aunque no llega a una inhibición completa.

***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. pino**

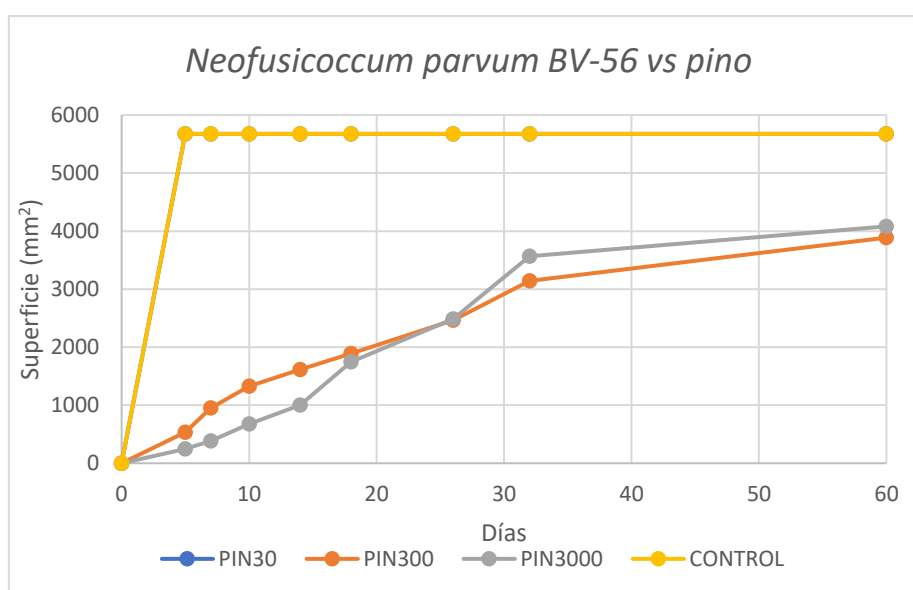


Figura 5: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la figura anterior (Figura 5) parece que el crecimiento con el AE de pino ha ejercido una menor resistencia al crecimiento del patógeno. Aunque los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm parecen seguir una línea de tendencia semejante, además el tratamiento de 3000 ppm ha perdido efectividad al perder materias activas cerca del final del primer mes.

El test de Kruskal Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,22267$ y probabilidad de $p = 0,0168$ indica que si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$)).

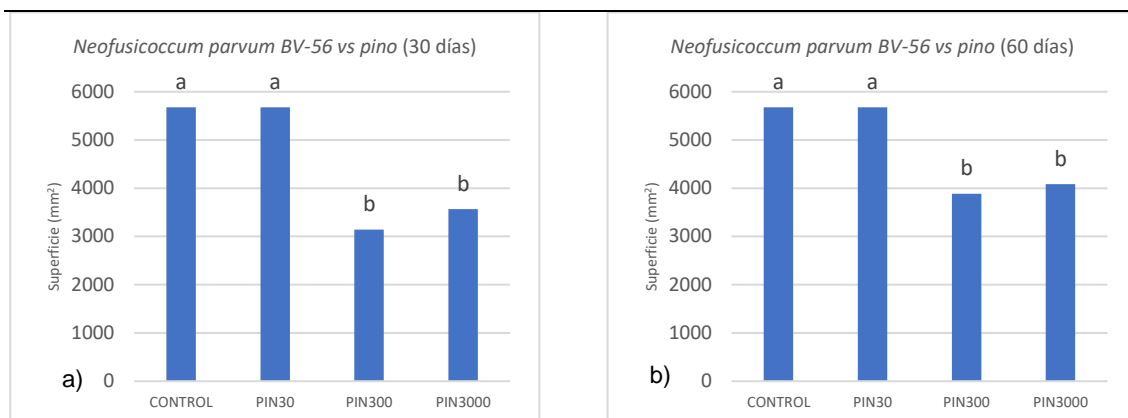


Figura 6: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con pino (PIN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

En la figura anterior (Figura 6), se observa la acción inhibitoria del tratamiento de 300 ppm y por supuesto, aunque ligeramente menor, la del 3000 ppm.

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 ppm y 3000 ppm (Tabla 6) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 6), aunque no llega a una inhibición completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	46,7
3000	58,0

Tabla 6: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de pino, a los 14 días.

***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. canela**

En la figura siguiente (Figura 7) se presenta la evolución en días de *Neofusicoccum parvum* en presencia de aceite esencial de canela, en la que podemos ver claramente cómo el tratamiento de 3000 ppm ha impedido el desarrollo del hongo patógeno. También parece que existe una menor eficacia de la concentración 300 ppm con la pérdida de volátiles. El efecto de la dosis de 30 ppm no se diferencia del control.

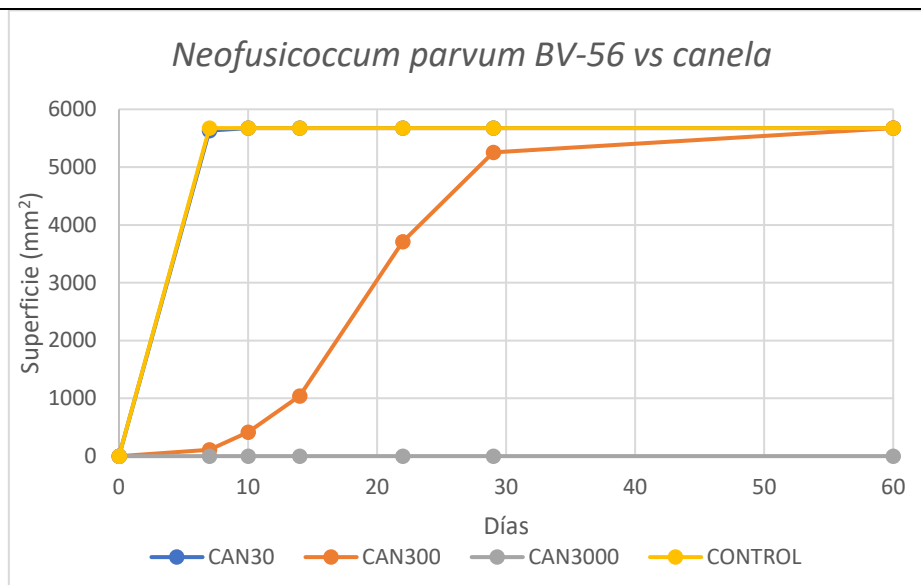


Figura 7: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test de Kruskal Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 9,500000$ con una probabilidad de $p = 0,0233$; por la que si existen diferencias significativas dado que $p < 0,05$). En la Figura 8 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

En la figura siguiente (Figura 8) se muestran las diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos, dónde, para los 30 y 60 días, no existen diferencias significativas entre los tratamientos de 300 y 30 ppm y el control (0 ppm). En cambio, para el tratamiento de 3000 ppm si se inhibe completamente al hongo.

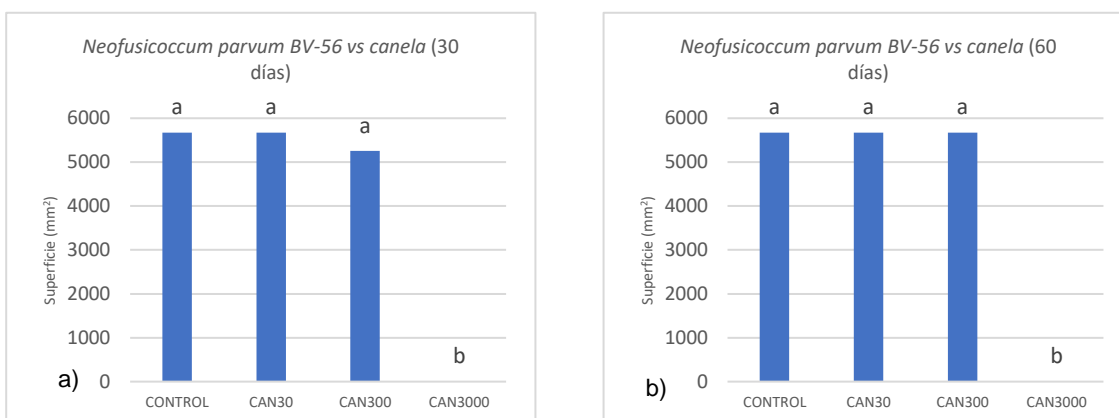


Figura 8: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con canela (CAN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 y 3000 ppm (Tabla 7) y aunque sólo es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 3000 ppm (Figura 8) dónde parece que tiene un comportamiento deletéreo frente al hongo patógeno.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	57,3
3000	98,8

Tabla 7: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de canela, a los 14 días.

***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. citronela**

En la siguiente figura (Figura 9) se observa el comportamiento del hongo frente al AE de citronela el tratamiento 300 ppm parece generar cierta inhibición y en las muestras de 3000 ppm el AE tiene un comportamiento deletéreo.

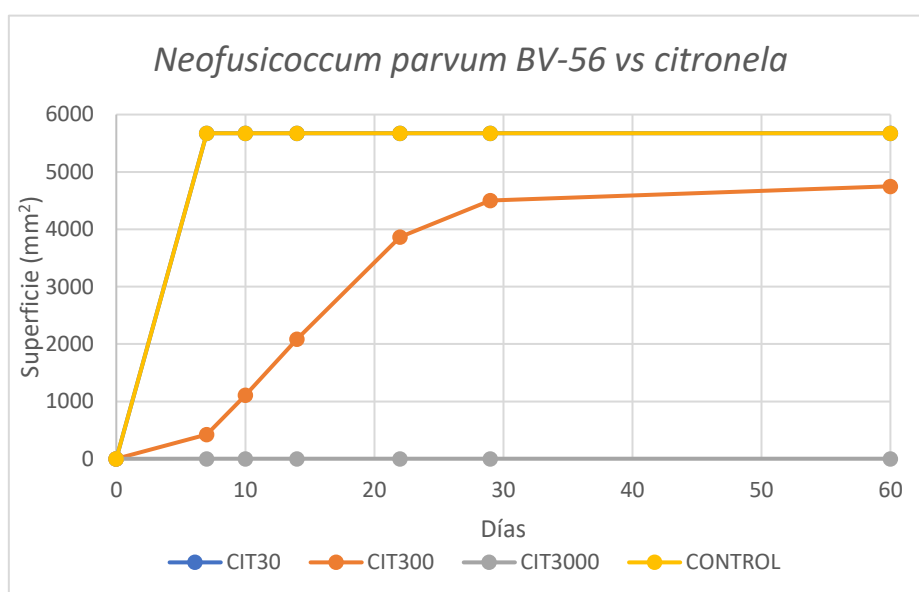


Figura 9: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

Se realiza el test de Kruskal Wallis; Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,69200$ con una probabilidad de $p = 0,0135$ asegurando que si existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). En la Figura 10 observamos los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney. Observamos que no existe una inhibición significativa en el crecimiento en el tratamiento de 300 ppm, así bien el tratamiento 3000 ppm inhibe de forma completa el crecimiento del hongo.

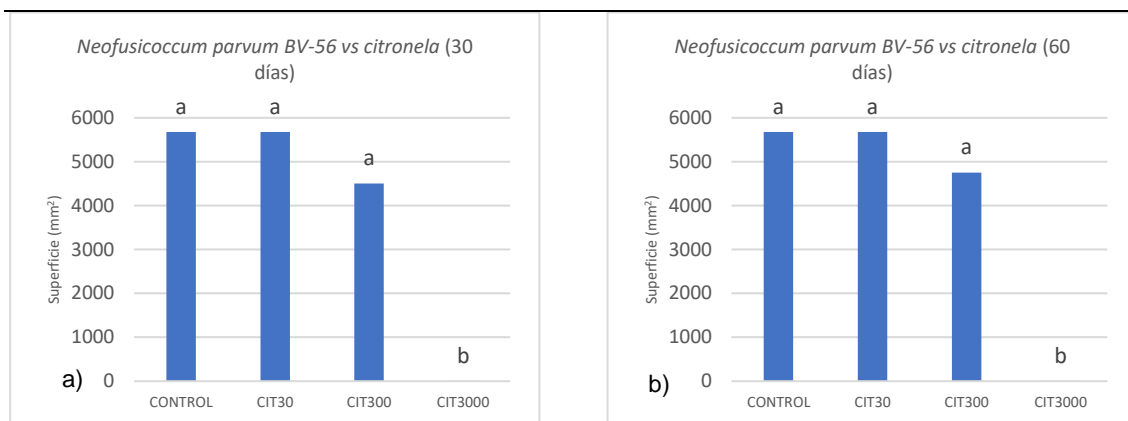


Figura 10: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 y 3000 ppm (Tabla 8) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 3000 ppm (Figura 10), llegando a una inhibición completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	40,4
3000	98,8

Tabla 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de citronela, a los 14 días.

***Neofusicoccum parvum* (BV-56) vs. clavo**

Como ha ocurrido en todos los casos con *Neofusicoccum parvum* en pocos días, el hongo, ha colonizado completamente la placa, como se ilustra en la figura siguiente (Figura 11) donde vemos que el tratamiento de 30 ppm sigue siendo insuficiente, parece que el tratamiento de 300 ppm tampoco lo es. Por último, el de 3000 ppm como en ocasiones anteriores elimina al hongo completamente.

El tratamiento 30 ppm (Figura 11) sigue siendo insuficiente, parece que el tratamiento de 300 ppm tampoco lo es. Por último, el de 3000 ppm como en ocasiones anteriores elimina al hongo completamente.

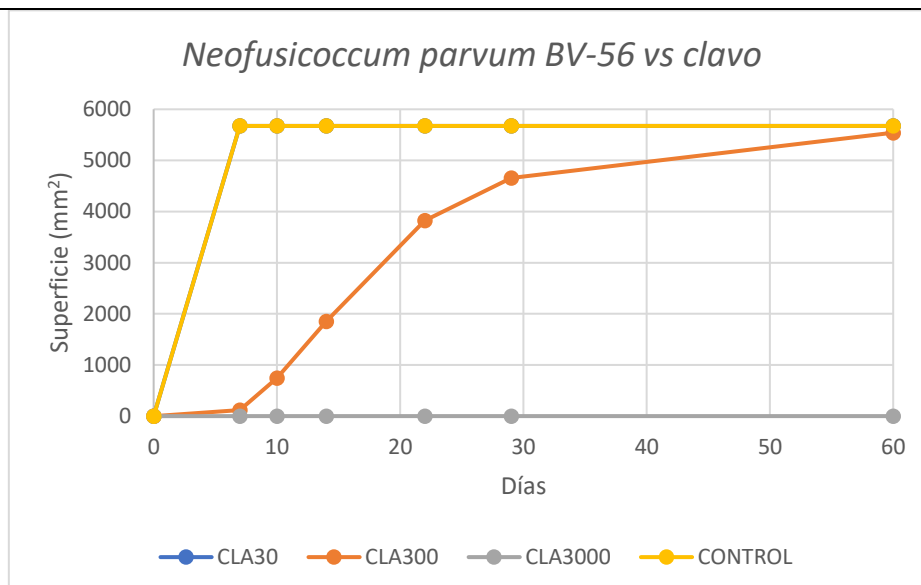


Figura 11: Evolución, en días, del crecimiento de *Neofusicoccum parvum*, en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$; encontramos diferencias significativas). En la Figura 12 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

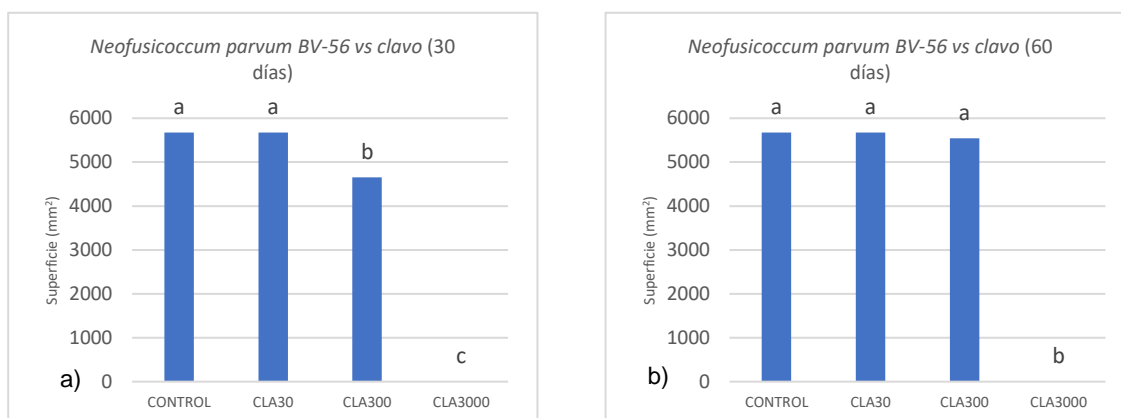


Figura 12: Crecimiento de *Neofusicoccum parvum* BV-56 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Neofusicoccum parvum* a los 14 días con dosis de 300 ppm y 3000 ppm (Tabla 9) además es estadísticamente significativa a los 30 días para la dosis de 300 ppm y también a 60 días la dosis de 3000 ppm (Figura 12), llegando esta última a una inhibición completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	0,0
300	43,1
3000	98,8

Tabla 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con aceite esencial de clavo, a los 14 días.

4.2.2 *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) vs. aceites esenciales.

Phaemoniella chlamydospora (PCH-33) vs. abeto

En la figura siguiente (Figura 13) siguiente podemos ver como una vez finalizado el primer mes con la pérdida de efectividad de las materias activas del AE en el 30 ppm el hongo sigue creciendo. Así bien podemos ver cómo con los tratamientos consecutivos, de 300 y 3000 ppm, el aceite le impide crecer al hongo. También, por primera vez vemos que *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) no ha llenado la placa completamente como sí hacía *Neofusicoccum parvum*.

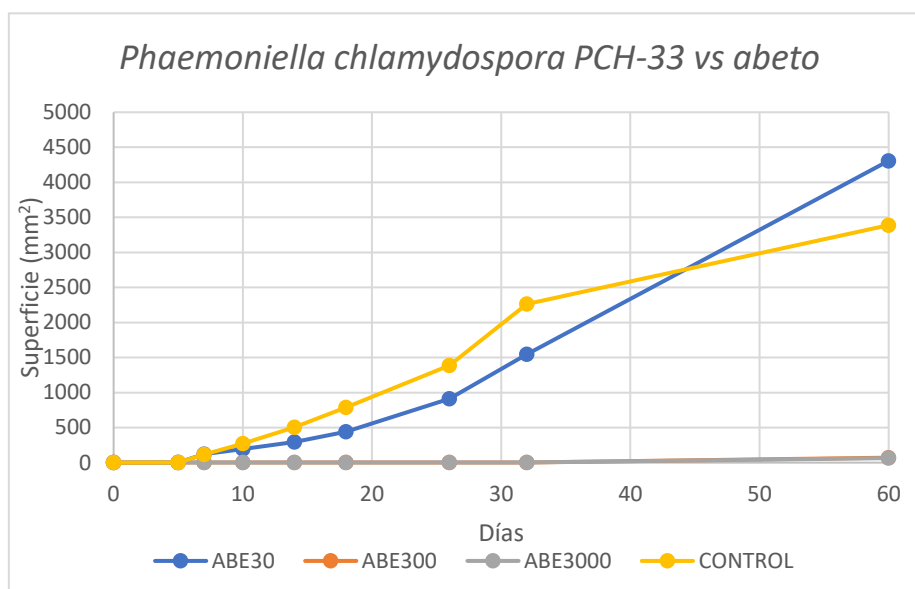


Figura 13: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$ resultando en diferencias significativas entre los diferentes tratamientos).

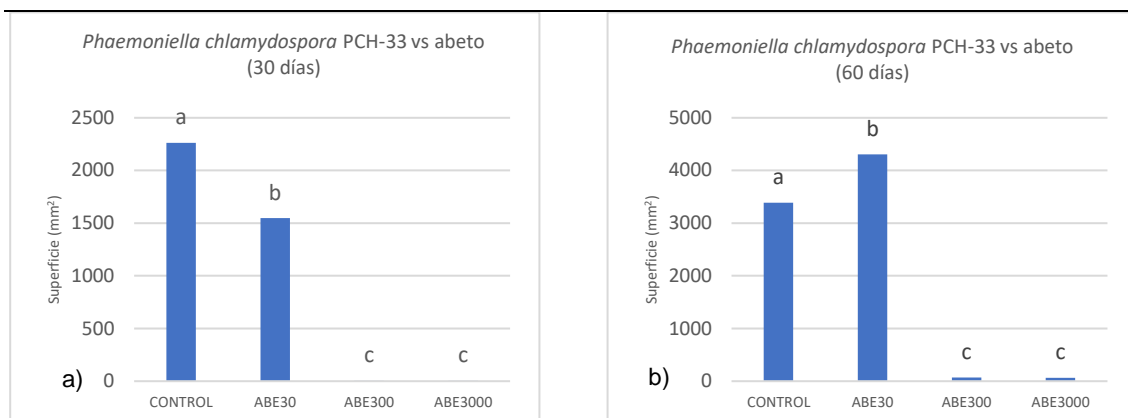


Figura 14: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 26 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 10) además es estadísticamente significativa (Figura 14) a los 30 días para los tres tratamientos; aunque al llegar a los 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm, llegando a una fuerte inhibición, casi completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	19,05
300	97,62
3000	97,62

Tabla 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), con aceite esencial de abeto, a los 26 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) vs. cedro**

En este caso (Figura 15) del AE de cedro es muy parecido al caso anterior (Figura 13) con el AE de abeto, para el tratamiento de 30 ppm, aunque siendo bastante más efectivo el AE de cedro para los tratamientos más concentrados 300 y 3000 ppm, algo que veremos a continuación (Figura 16) tras el tratamiento estadístico de los datos.

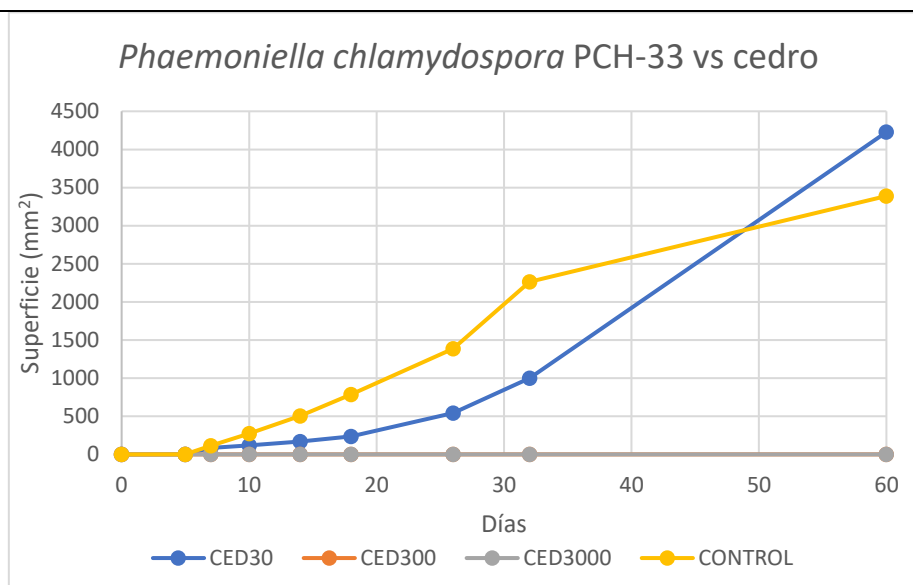


Figura 15: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,69200$ con una probabilidad de $p = 0,0135$. Existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$)).

A continuación (Figura 16), observamos cómo el tratamiento con AE de cedro tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo y cómo a partir del tratamiento 300 ppm no aparece crecimiento en las placas.

Como ya ha ocurrido anteriormente para el tratamiento de 30 ppm (Figura 16) el tratamiento ha retenido el crecimiento del hongo, pero al perder sus características, por la volatilización de sus componentes.

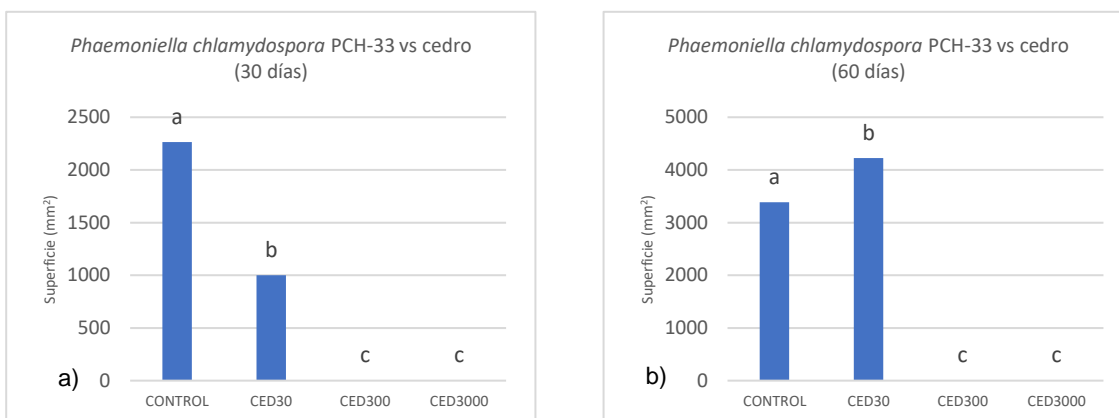


Figura 16: Crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* PCH-33 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaeoniella chlamydospora* a los 26 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 11) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 16), llegando a una inhibición completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	37,3
300	97,6
3000	97,6

Tabla 11: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), con aceite esencial de cedro, a los 26 días.

Phaemoniella chlamydospora (PCH-33) vs. pino

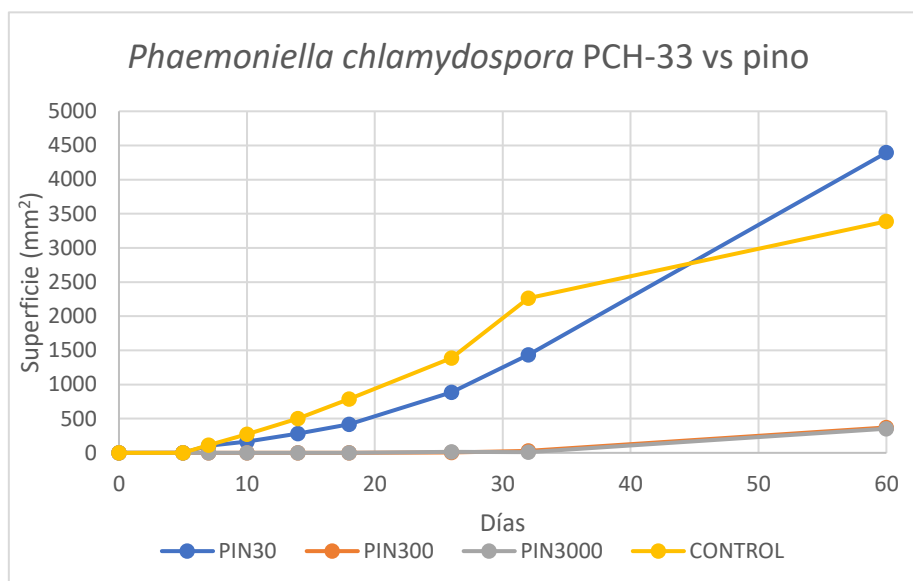


Figura 17: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la figura anterior (Figura 17) anterior podemos ver el efecto de la pérdida de volátiles que ya se ha comentado en el tratamiento 30 ppm y que una vez que se ha perdido cierta inhibición el hongo ha vuelto a crecer incluso más que el control. También, como ya hemos observado anteriormente la pérdida de compuestos activos pertenecientes al AE ha hecho que se aprecie crecimiento en el segundo mes en los tratamientos 300 y 3000 ppm.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 9,506667$ con una probabilidad de $p = 0,0233$ resultando, como era previsible que entre los diferentes tratamientos encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$)).

A continuación, gracias al test de U de Mann Whitney (Figura 18) podemos comparar las diferencias significativas llegando a la conclusión en la que 300 ppm es realmente la dosis inhibitoria para el patógeno con AE de pino.

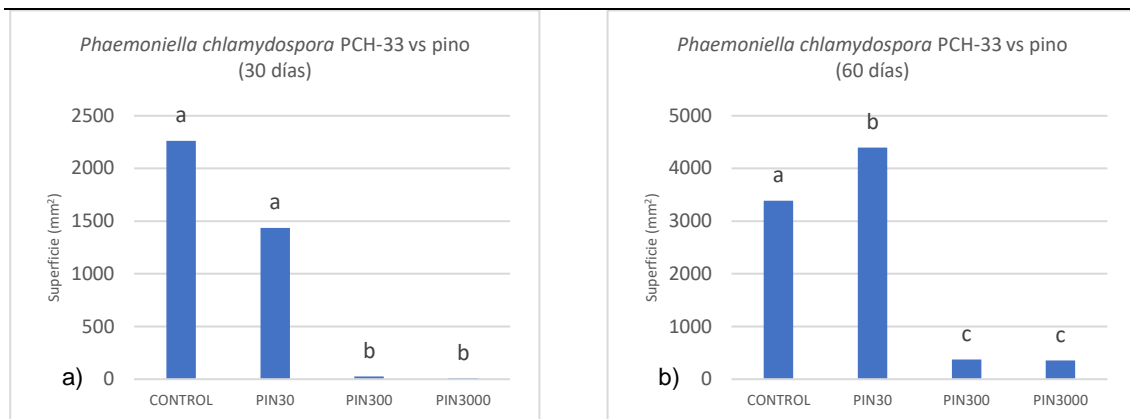


Figura 18: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 con pino (PIN) a los 30 y 60 días. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 26 días con dosis de 300 y 3000 ppm (Tabla 12). Es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 18), aunque no llegan a una inhibición completa

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	22,2
300	94,4
3000	92,9

Tabla 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), con aceite esencial de pino, a los 26 días.

Phaemoniella chlamydospora (PCH-33) vs. canela

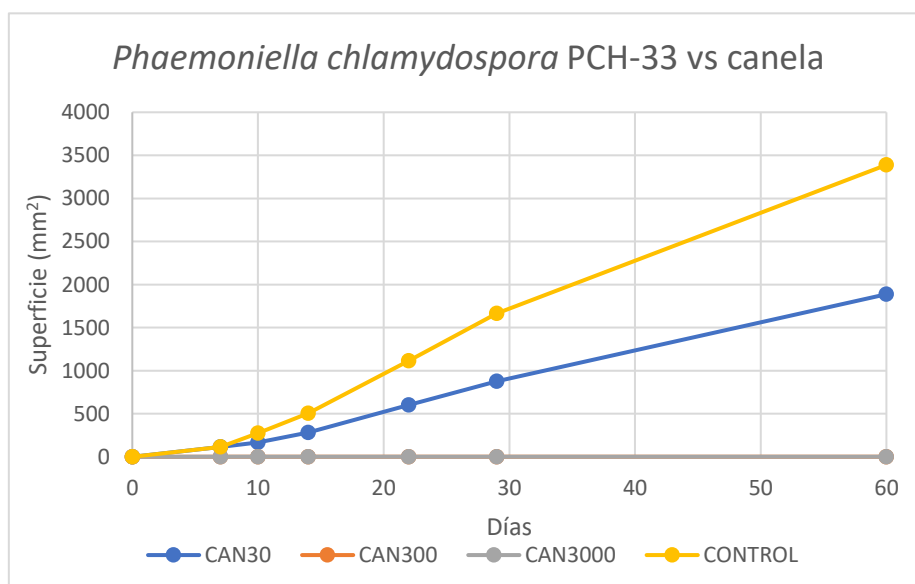


Figura 19: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la figura anterior (Figura 19) podemos observar que el AE de canela tiene un efecto inhibitorio bastante fuerte como tratamiento sobre el hongo *in vitro* para todos los tratamientos desde el tratamiento 30 ppm en la que se ha reducido sobre un 45,9% hasta los 300 y 3000 ppm que no ha crecido prácticamente nada, durante todas las semanas del estudio.

En la siguiente figura (Figura 20), se ilustran las significancias obtenidas de los datos que se han medido. El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$; con una probabilidad de $p = 0,0138$) da diferencias significativas. Por tanto, usando el test de U de Mann Whitney, encontramos dónde están las diferencias significativas. Principalmente el tratamiento 30 ppm ejerce suficiente disminución en el crecimiento para ser considerado inhibitorio y los tratamientos siguientes 300 y 3000 ppm son deletéreos para el hongo.

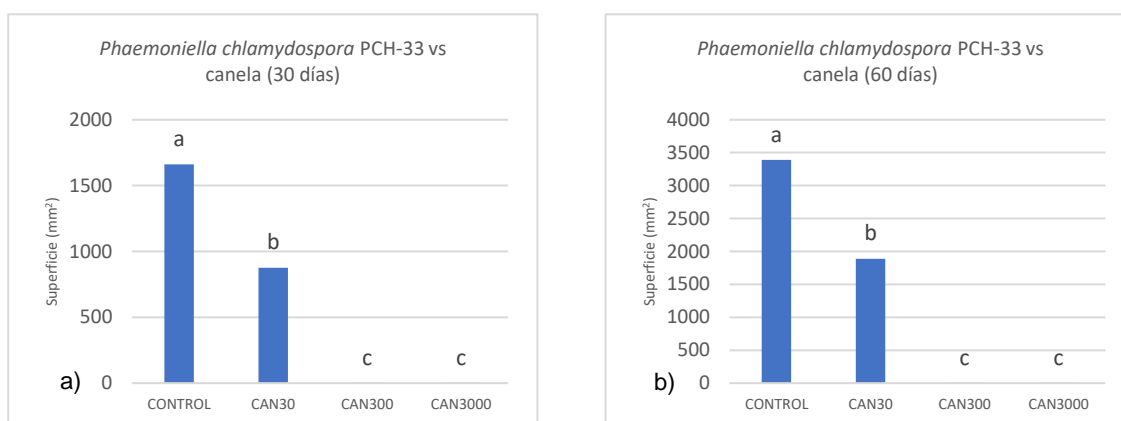


Figura 20: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 con canela (CAN) a los 30 y 60 días *in vitro*. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 13) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días todas las dosis 30, 300 y 3000 ppm (Figura 20), llegando a una inhibición completa en el caso de 300 y 3000 ppm.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	27,4
300	97,3
3000	97,3

Tabla 13: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) con aceite esencial de canela, a los 22 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) vs. citronela**

En la siguiente figura (Figura 21) podemos ver cómo el 30 ppm de AE de citronela tiene un menor efecto; que el AE de canela (Figura 19), sobre el crecimiento del patógeno. En cuanto a las concentraciones más altas 300 y 3000 ppm el AE de citronela parece erradicar por completo el desarrollo del patógeno.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,69200$ con una probabilidad de $p = 0,0135$; ($p < 0,05$)). Por tanto si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

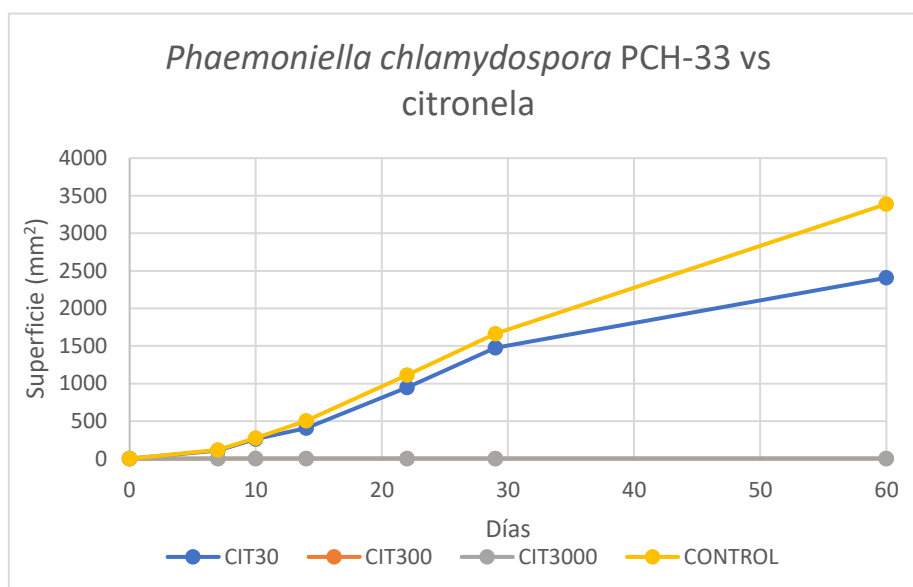


Figura 21: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la figura siguiente (Figura 22) siguiente podemos observar que si existe una disminución en el crecimiento en las placas con el tratamiento 30 ppm, y cómo el tratamiento tiene una efectividad prácticamente total en las pruebas con 300 y 3000 ppm.

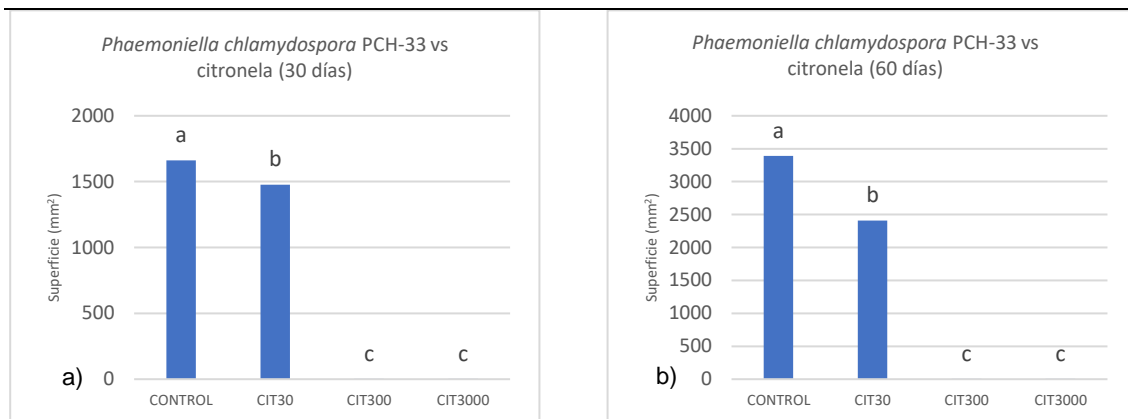


Figura 22: Crecimiento de *Paemoniella chlamydospora* PCH-33 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Paemoniella chlamydospora* (PCH-33) a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 14) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Figura 22), llegando a una inhibición completa para los dos últimos.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	8,0
300	97,3
3000	97,3

Tabla 14: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Paemoniella chlamydospora* (PCH-33) con aceite esencial de citronela, a los 22 días.

Paemoniella chlamydospora (PCH-33) vs. clavo

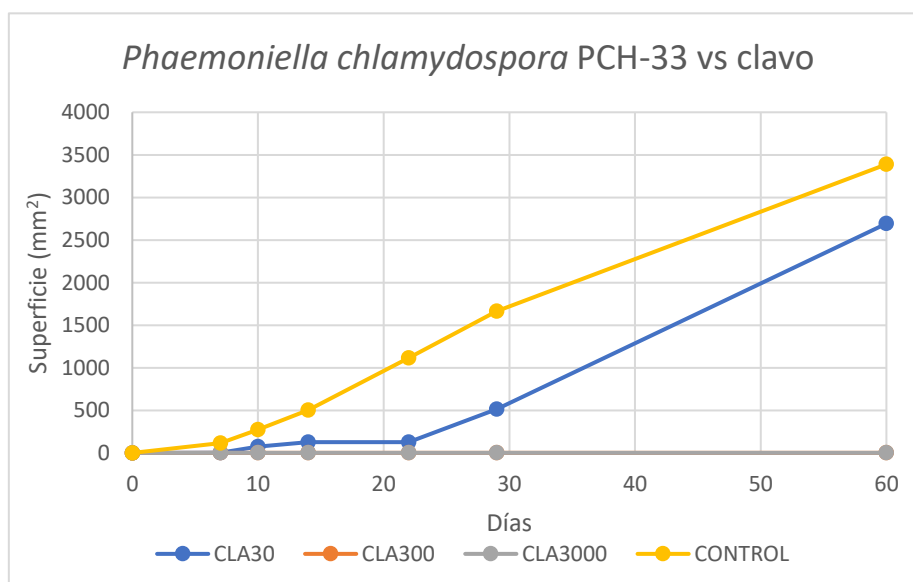


Figura 23: Evolución, en días, del crecimiento de *Paemoniella chlamydospora* PCH-33, en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En este nuevo caso (Figura 23) con AE de clavo frente a *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), previsiblemente, el tratamiento 30 ppm si está funcionando como agente inhibidor del crecimiento del patógeno. Aunque ocurre algo similar al caso anterior que usamos AE de clavo frente a *Neofusicoccum parvum* (Figura 11) con la concentración 300 ppm, que causó disminución del crecimiento, el aceite perdió bastante efectividad con el tiempo.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,69200$ da una probabilidad de $p = 0,0135$ y como $p < 0,05$ existen diferencias significativas).

En la siguiente figura (Figura 24) podemos ver la significancia real de cada uno de los tratamientos. Comenzando por el tratamiento 30 ppm, que si reduce el crecimiento del patógeno, al menos para los 30 primeros días, y continuando por los tratamientos 300 y 3000 ppm que paran completamente cualquier crecimiento en la placa.

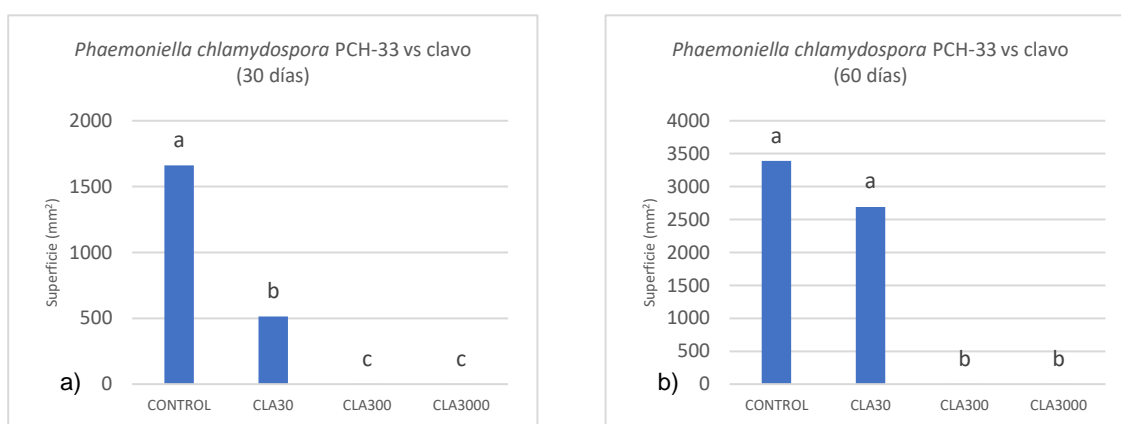


Figura 24: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

En la siguiente tabla (Tabla 15) se muestran los altos porcentajes de inhibición, en los tres casos, concuerdan bastante bien con las diferencias aportadas por la U de Mann Whitney. Sin embargo, a largo plazo (60 días, Figura 24b) la dosis de 30 ppm pierde su efecto.

Existe una alta reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 15) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 24), llegando a una inhibición completa

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	66,4
300	97,3
3000	97,3

Tabla 15: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) con aceite esencial de clavo (CLA), a los 22 días.

4.2.3 *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) vs aceites esenciales

Phaemoniella chlamydospora (BV-287) vs. abeto

En este nuevo escenario (Figura 25) con una cepa diferente de *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) aislada de vides infectadas de La Rioja se observa en el tratamiento 30 ppm que sigue un comportamiento bastante parecido al control. Se puede percibir un aumento en el crecimiento al ejercer menos efecto el aceite por la volatilización de sus componentes. En este momento el hongo en lugar de aprovechar como ha hecho *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33) anteriormente (Figura 13, Figura 15, Figura 17) se ha mantenido por debajo del control, pareciendo de menor crecimiento a lo largo del tiempo esta variante del hongo. En las repeticiones con concentraciones 300 y 3000 ppm si se percibe la inhibición prácticamente total del hongo.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 9,636000$ con una probabilidad de $p = 0,0219$. Por tanto, existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ya que $p < 0,05$).

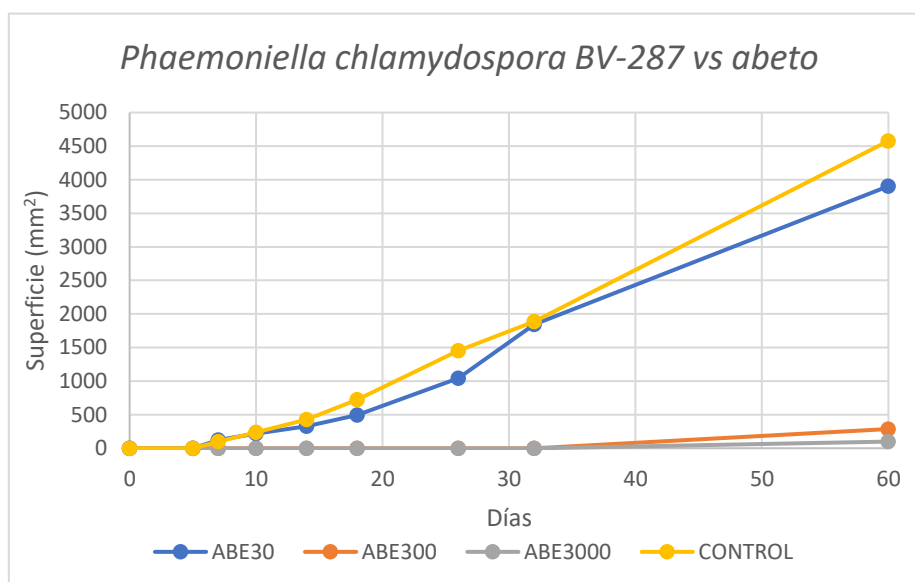


Figura 25: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de abeto (ABE) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la siguiente figura (Figura 26) siguiente se muestran los resultados del test de la U de Mann Whitney, para comparar las diferencias significativas con $p < 0,05$. Parece que el tratamiento 30 ppm, no es suficiente para retener el crecimiento. En cambio, con las concentraciones más altas de 300 ppm y 3000 ppm el tratamiento para casi completamente el crecimiento del hongo.

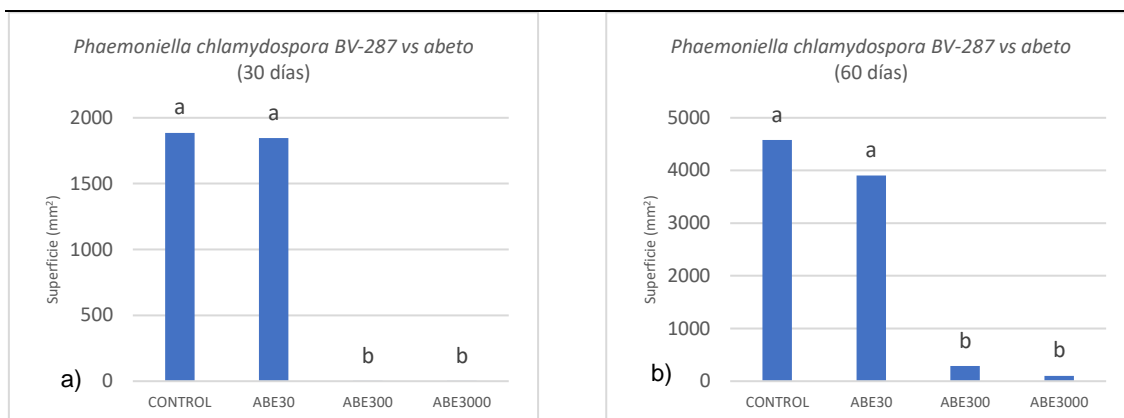


Figura 26: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287 con abeto (ABE) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una alta reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) a los 26 días con dosis de 300 y 3000 ppm (Tabla 16) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 26), no llegando a una inhibición completa

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	15,5
300	97,7
3000	97,7

Tabla 16: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de abeto, a los 26 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) vs. cedro**

Para el tratamiento de *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con AE de cedro encontramos un caso realmente parecido al mostrado para el aceite de abeto con este mismo patógeno (Figura 27) aunque si existe una pequeña diferencia en el tratamiento 30 ppm, siendo aquí algo más efectivo. También podemos encontrar una constante que está presente en prácticamente la totalidad de los casos y es la pérdida de efectividad en torno al primer mes de muestreo. Aquí podemos apreciarlo en el 30 ppm y en menor medida, aunque sigue presente 300 ppm, dónde el tratamiento no ha conseguido eliminar el hongo, únicamente ha podido inactivarlo durante el primer mes.

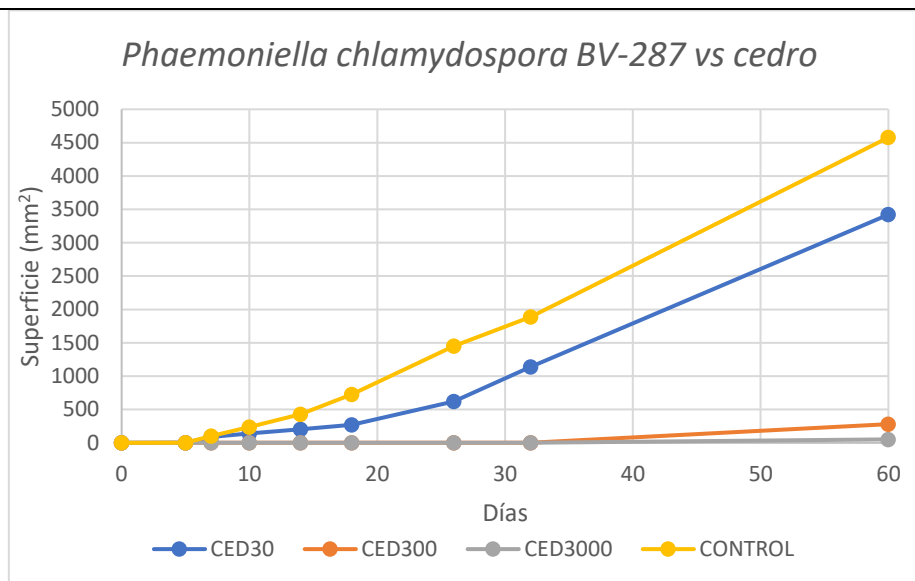


Figura 27: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de cedro (CED) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$ por la que existen diferencias significativas ($p < 0,05$)).

En la figura siguiente (Figura 28) se observan las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En 30 ppm se aprecia inhibición respecto al control. Los tratamientos más agresivos en cambio impiden el crecimiento del hongo.

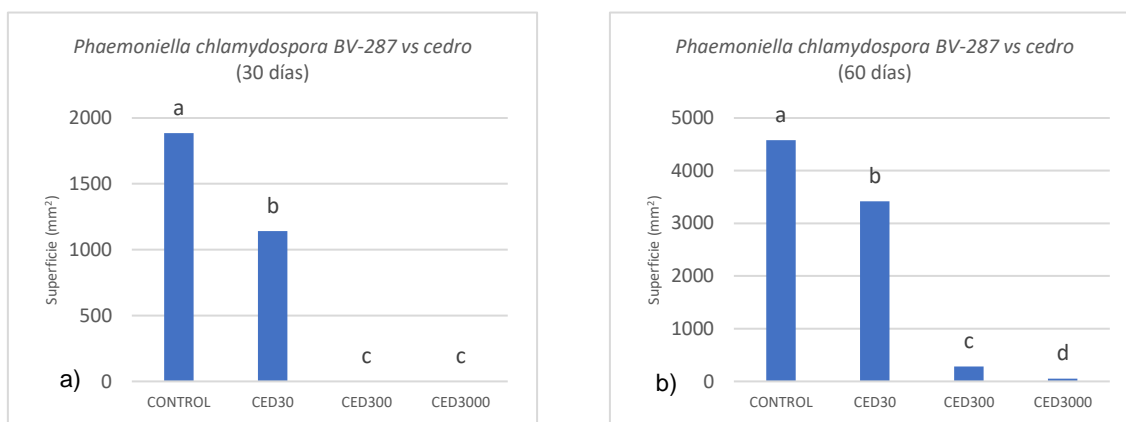


Figura 28: Crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* BV-287 con cedro (CED) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaeoniella chlamydospora* a los 26 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 17) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 300 y 3000 ppm (Figura 28), llegando a una inhibición casi completa.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	34,9
300	97,7
3000	97,7

Tabla 17: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de cedro (CED), a los 26 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) vs. pino**

En cuanto al tratamiento de AE de pino sobre *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) observamos en la próxima figura (Figura 29) cómo el tratamiento 30 ppm ejerce cierta inhibición y los tratamientos 300 y 3000 ppm no se presenta crecimiento, aunque no acaban con el hongo ya que a los dos meses se percibe crecimiento del patógeno.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$, encontrando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$)).

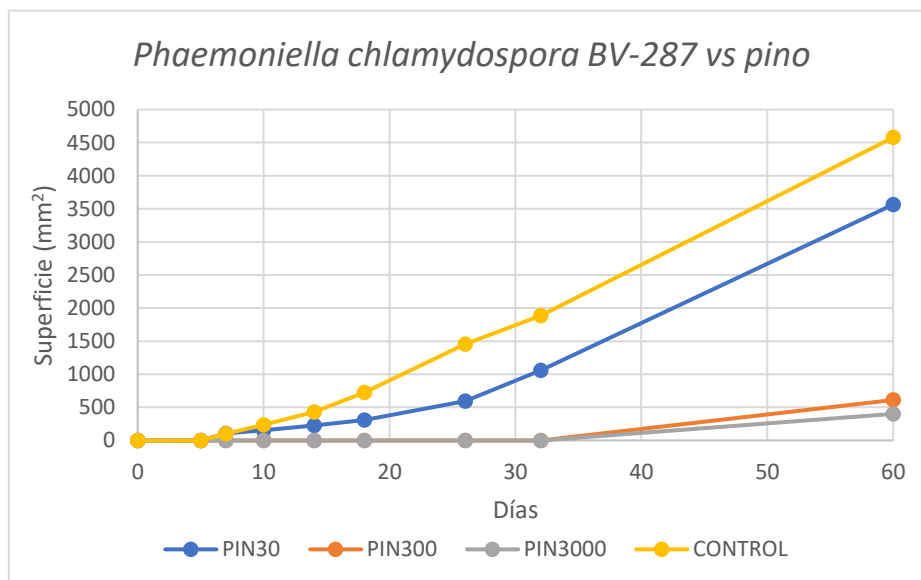


Figura 29: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de pino (PIN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

En la siguiente figura (Figura 30) se muestran las diferencias significativas entre los tratamientos. En él se aprecia bien la disminución en el crecimiento por parte del tratamiento 30 ppm y cómo en los consecutivos tratamientos 300 y 3000 ppm inhibe completamente el crecimiento, aunque el hongo no desaparece completamente.

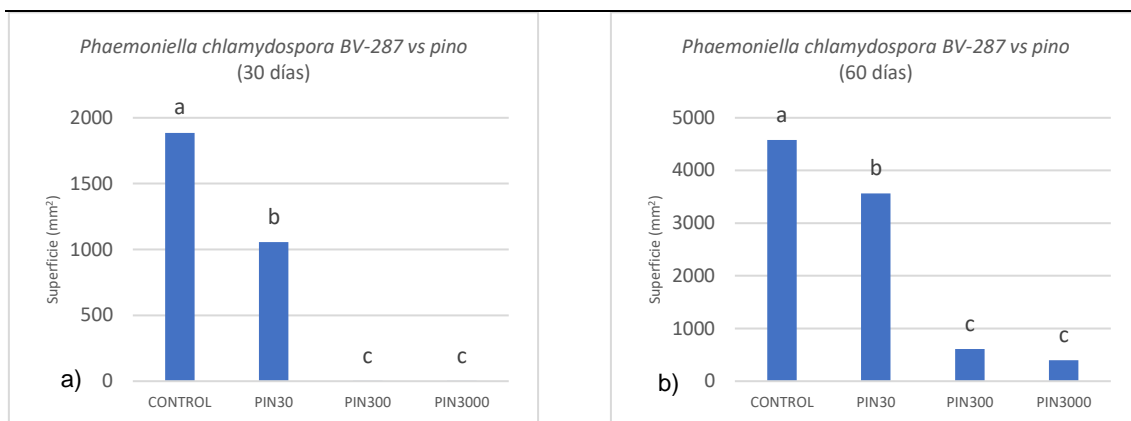


Figura 30: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287 con pino (PIN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una alta reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 26 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 18) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Figura 30), llegando a una inhibición casi completa para las concentraciones de 300 y 3000 ppm.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	36,4
300	97,7
3000	97,7

Tabla 18: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de pino, a los 26 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) vs. canela**

En cuanto al AE de canela (Figura 31) encontramos que su fuerte poder inhibitorio se vuelve a hacer notar frente a BV-287; no dejando que crezca el hongo para los tratamientos 300 y 3000 ppm y generando cierta inhibición por parte del tratamiento 30 ppm. En este caso no se percibe una mayor agresividad por parte del hongo al perderse compuestos volátiles del AE como si pudo ocurrir en el caso de *Neofusicoccum parvum* (BV-56) frente al mismo AE de canela (Figura 7).

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$) muestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). En la Figura 31 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

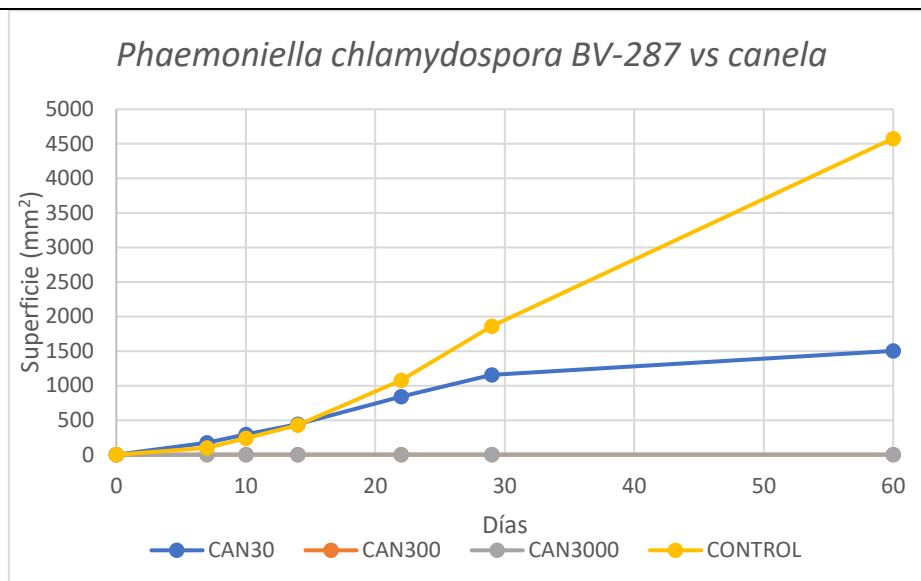


Figura 31: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de canela (CAN) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

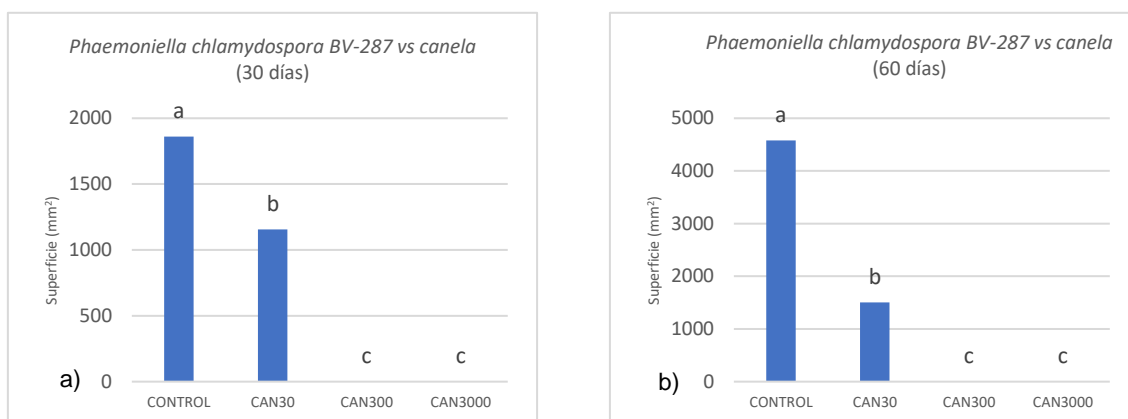


Figura 32: Crecimiento de *Phaeoniella chlamydospora* BV-287 con canela (CAN) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una alta reducción del crecimiento del patógeno *Phaeoniella chlamydospora* a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 19) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Figura 32), llegando a una inhibición completa para las concentraciones de 300 y 3000 ppm.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	11,7
300	97,3
3000	97,3

Tabla 19: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaeoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de canela, a los 22 días.

***Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) vs. citronela**

En la figura siguiente (Figura 33) el crecimiento del hongo con AE de canela ha ejercido cierta resistencia al patógeno con el tratamiento de 30 ppm. Los tratamientos de 300 y 3000 ppm han inhibido completamente el crecimiento del hongo.

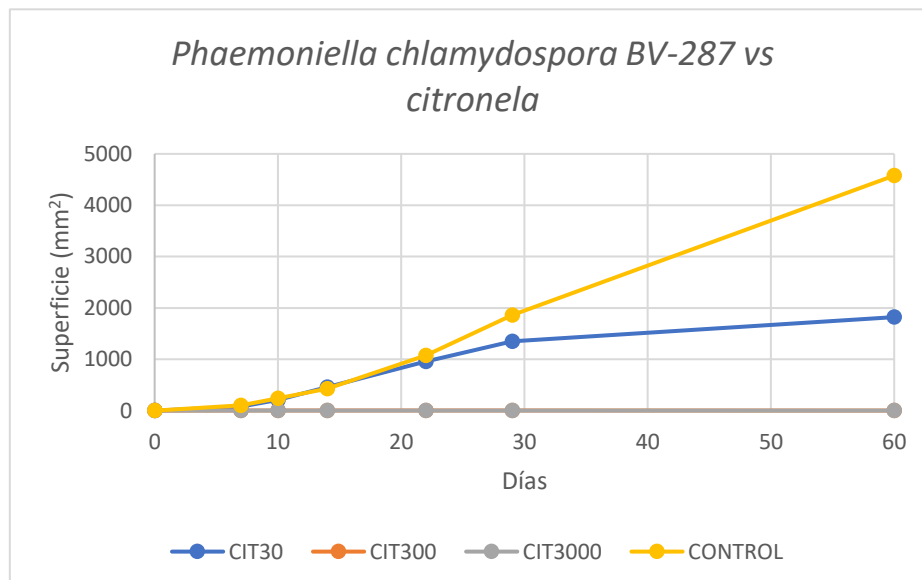


Figura 33: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de citronela (CIT) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,69200$ con una probabilidad de $p = 0,0135$) muestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). En la Figura 34 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

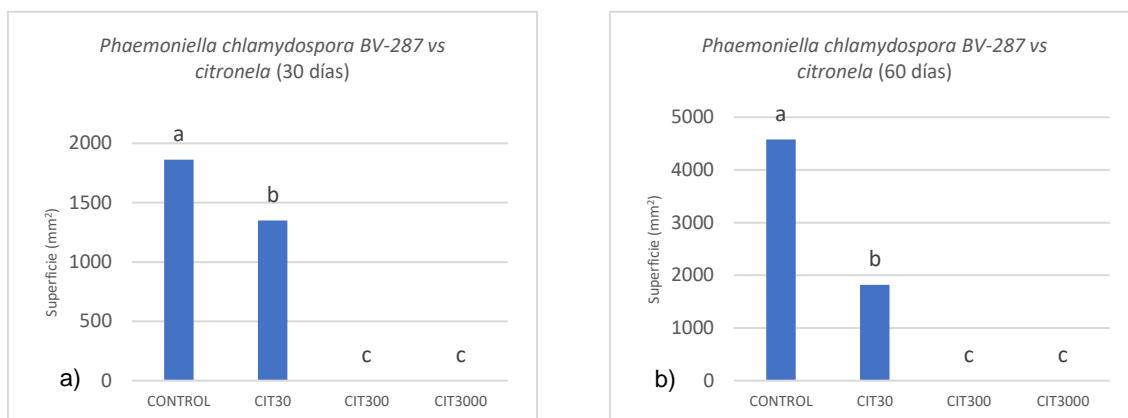


Figura 34: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287 con citronela (CIT) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

Existe una alta reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 20) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Figura 34), llegando a una inhibición completa para las concentraciones de 300 y 3000 ppm.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	6,3
300	97,3
3000	97,3

Tabla 20: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de citronela, a los 22 días.

Phaemoniella chlamydospora (BV-287) vs. clavo

El tratamiento 30 ppm (Figura 35) parece haber inhibido modestamente al hongo, en cambio los tratamientos 300 ppm y 3000 ppm lo han inhibido completamente.

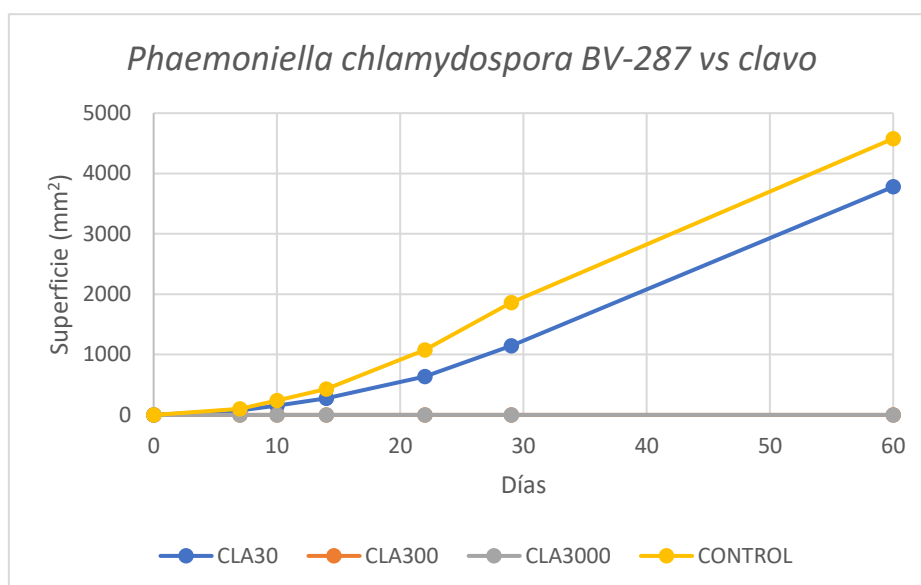


Figura 35: Evolución, en días, del crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287, en placa frente a AE de clavo (CLA) en diferentes tratamientos: 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y Control.

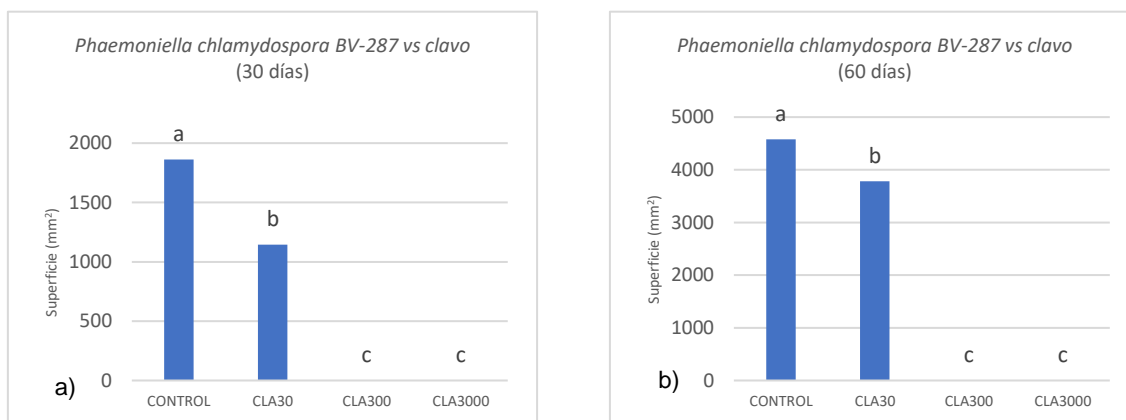


Figura 36: Crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* BV-287 con clavo (CLA) a los 30 y 60 días in vitro. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p > 0,05$).

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=12) = 10,64940$ con una probabilidad de $p = 0,0138$) muestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). En la Figura 36 podemos observar los valores alcanzados y sus diferencias estadísticas en el test U de Mann Whitney.

Existe una reducción del crecimiento del patógeno *Phaemoniella chlamydospora* a los 22 días con dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Tabla 21) además es estadísticamente significativa a los 30 y 60 días la dosis de 30, 300 y 3000 ppm (Figura 36), llegando a una inhibición completa para los tratamientos de 300 y 3000 ppm.

Dosis (ppm)	PICR (%)
30	23,4
300	97,3
3000	97,3

Tabla 21: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). De *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) con aceite esencial de clavo, a los 22 días.

Con los datos obtenidos, se puede observar que los aceites esenciales utilizados si ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos patógenos estudiados, *in vitro*. Esta eficiencia *in vitro* coincide con los trabajos anteriores desarrollados en el laboratorio frente a diferentes patógenos donde este tipo de procedimiento en placas siempre ha generado resultados estadísticamente significativos (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016; Villaolmillos Abarquero et al., 2018).

El análisis de PICR (inhibición crecimiento radial) muestra casi siempre una reducción de crecimiento en todas las dosis en las primeras semanas pero observamos que al continuar el experimento durante más semanas el crecimiento en superficie continua y las dosis más bajas dejan de ser efectivas. Es posible que para su aplicación sobre planta sea más conveniente, o al menos más económica, una aplicación repetida de dosis más bajas que pueden conseguir efecto inhibitorio aunque no siempre es suficiente como el caso del trabajo de Valdeolmillos ((Villaolmillos Abarquero et al., 2018)) donde una dosis repetida de 300 ppm de AE de canela era eficiente frente a *Botrytis* pero no frente a *Fusarium oxysporum* y *Penicillium*.

Para ver los resultados de forma global, a continuación, se muestran las concentraciones que estadísticamente disminuyen el crecimiento, para los 30 (Tabla 22) y los 60 días (Tabla 23), de los patógenos.

AE	PCH33	BV-287	BV-56
CANELA (ppm)	30	30	3000
CITRONELA (ppm)	30	30	3000
CLAVO (ppm)	30	30	300
ABETO (ppm)	30	300	3000
CEDRO (ppm)	30	30	300
PINO (ppm)	300	30	300

Tabla 22: Disminución del crecimiento para los 30 primeros días de los hongos patógenos estudiados; *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), frente a los AE.

AE	PCH33	BV-287	BV-56
CANELA (ppm)	30	30	3000
CITRONELA (ppm)	30	30	3000
CLAVO (ppm)	30	30	3000
ABETO (ppm)	300	300	3000
CEDRO (ppm)	300	30	300
PINO (ppm)	300	30	300

Tabla 23: Disminución del crecimiento para los 60 primeros días de los hongos patógenos estudiados; *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), frente a los AE.

Como ya hemos visto anteriormente los tratamientos son más efectivos a un menor plazo (Tabla 22) que a plazos más largos (Tabla 23), aunque las dos tablas tienen bastantes similitudes.

Los aceites tradicionales (canela, citronela y clavo) han tenido un muy buen comportamiento inhibitorio frente a las dos cepas de *Phaemoniella chlamydospora* a 30 y 60 días (Tabla 22, Tabla 23) teniendo un comportamiento inhibitorio a concentraciones de 30 ppm.

En trabajos anteriores se han evaluado los aceites de canela, citronela y clavo frente a *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium*; buscando las dosis efectivas para el control biológico (Tabla 24) (Novoa Bueno et al., 2018).

AE	<i>Alternaria</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Canela (ppm)	300	30	300	22
Citronela (ppm)	300	300	1200	900
Clavo (ppm)	300	300	300	240

Tabla 24: Tabla elaborada con datos provenientes de estudios anteriores (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016), inhibiciones de los hongos *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* obtenidas a las 4 semanas.

Los datos de anteriores (Tabla 24), sólo se pueden comparar con la tabla 22 ya que los datos se han medido en torno a un mes de crecimiento.

En la tabla 22 se observa cómo los aceites esenciales canela, citronela y clavo generan una inhibición del crecimiento para las dos cepas de *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33, BV-287) estudiadas (en el presente proyecto) a una concentración menor que en los hongos patógenos estudiados por Novoa. Con la excepción del aceite esencial de canela frente a *Botrytis cinerea* que la concentración inhibitoria en ambos casos se establece en 30 ppm; con unos datos de crecimiento equivalente en los tres casos ($\approx 1200 \text{ mm}^2$ de superficie del micelio de los hongos).

El aceite esencial de clavo (tabla 22) frente a *Neofusicoccum parvum* (BV-56) puede compararse con los resultados de Novoa (Tabla 24) ya que si tienen valores equivalentes (300 ppm), para el resto de los aceites su efecto inhibitorio se alcanza a concentraciones mucho más altas (3000 ppm)

Según vemos en la tabla 22 y la tabla 23 *Neofusicoccum parvum* (BV-56) necesita siempre unas concentraciones mayores (normalmente 3000 ppm) para sufrir inhibición en el crecimiento. Hay que tener en cuenta que su crecimiento es mucho más rápido que el del otro patógeno (*Phaemoniella chlamydospora*) como se puede ver en el crecimiento de las placas control.

Los AE forestales (abeto, cedro y pino) se han seleccionado por su novedad ya que no se encuentran en la bibliografía como los que hemos denominado tradicionales (clavo, canela y citronela) que se han aplicado en muchos patógenos, aunque no con los presentes. Estos aceites de origen forestal han resultado en una efectividad (en general) menor, aunque los AE de cedro y pino han demostrado un mayor efecto inhibitorio frente a *Neofusicoccum parvum*, para 30 y 60 días (Tabla 22, Tabla 23), como ya hemos visto uno de los hongos más agresivos de la enfermedad de decaimiento por *Botryosphaeria* (J R Úrbez-Torres & Gubler, 2009) ya que con una concentración de 300 ppm ha conseguido inhibir al hongo.

El AE de pino (Tabla 22) ha necesitado una mayor concentración (300 ppm) para inhibir el patógeno *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), cuando el resto ha podido ralentizar el crecimiento a dosis más bajas de 30 ppm, en los 30 primeros días. En cuanto a los 30 días siguientes (Tabla 23) (60 días) el AE de pino se ha mantenido en los 300 ppm y el de cedro ha hecho efecto, también, a una concentración de 300 ppm para el citado patógeno *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33).

El AE de abeto, el tercer aceite forestal, ha sido el que ha obtenido peores resultados. Siendo el único de los aceites en necesitar una concentración de 300 ppm para inhibir el crecimiento de *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287). La dosis mínima que ha inhibido a los patógenos para los 60 días (Tabla 23) es la de 300 ppm para ambas cepas de *Phaemoniella chlamydospora* y 3000 ppm para *Neofusicoccum parvum*, en un plazo de 30 días.

Aunque este proyecto no tiene como objetivo la búsqueda de la Concentración mínima inhibitoria (CMI), en la que el control de los hongos es del 100%, si es interesante desde el punto de vista aplicado. En los trabajos anteriores (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016)) como en el presente se evalúan las concentraciones que producen diferencias significativas de crecimiento y aunque es muy interesante desde el punto de vista científico, desde un punto de vista práctico, una reducción de crecimiento significativa puede no ser económicamente rentable o aceptable como un tratamiento fitosanitario. Por ello, se ha considerado importante reflejar que concentraciones inhiben completamente el crecimiento tanto en la valoración inicial de PICR como a largo plazo en los 30-60 días (Tablas 25 y 26).

AE	PCH33	BV-287	Neo BV-56
CANELA (ppm)	300	300	3000
CITRONELA (ppm)	300	300	3000
CLAVO (ppm)	300	300	3000
ABETO (ppm)	300	300	-
CEDRO (ppm)	300	300	-
PINO (ppm)	300	300	-

Tabla 25: Inhibición total del crecimiento para los 30 primeros días de los hongos patógenos estudiados; *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), frente a los AE.

A primera vista, llama la atención que los AE forestales (Tabla 26) han perdido prácticamente la eficacia a excepción del AE de cedro frente a *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33). Aunque a los 30 días (Tabla 25) para ambas cepas de *Phaemoniella chlamydospora* la concentración que las inhibe totalmente es de 300 ppm, para todos los AE forestales (abeto, cedro, pino). Frente a *Neofusicoccum parvum* ningún AE forestal, a ninguna concentración, inhibe completamente el crecimiento del hongo en ninguna de las situaciones 30 y 60 días (Tabla 25, Tabla 26).

AE	PCH33	BV-287	Neo BV-56
CANELA (ppm)	300	300	3000
CITRONELA (ppm)	300	300	3000
CLAVO (ppm)	300	300	3000
ABETO (ppm)	-	-	-
CEDRO (ppm)	300	-	-
PINO (ppm)	-	-	-

Tabla 26: Inhibición total del crecimiento para los 60 primeros días de los hongos patógenos estudiados; *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), frente a los AE.

AE	<i>Alternaria</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Canela (ppm)	3000	-	3000	3000
Citronela (ppm)	1500	1500	3000	900
Clavo (ppm)	300	3000	300	3000

Tabla 27: Tabla elaborada con datos provenientes de estudios anteriores (Arribas, 2018; Novoa Bueno et al., 2018; Sánchez del Valle et al., 2016), inhibiciones totales de los hongos *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* obtenidas a las 4 semanas.

En cuanto a los otros AE, canela, citronela y clavo, no cambian (Tabla 25, Tabla 26) en ninguno de los dos casos (30 y 60 días) para ambas cepas de *Phaemoniella chlamydospora* la concentración deletérea para el hongo es de 300 ppm. En cuanto a *Neofusicoccum parvum* se debe aumentar la concentración a 3000 ppm, también en ambos casos 30 y 60 días.

Respecto a los datos aportados por Novoa (Tabla 27) el AE de canela no puede inhibir a *B. cinerea* y al resto de patógenos necesita la dosis máxima de 3000 ppm equivalente a la dosis necesaria para inhibir a *Neofusicoccum parvum*. Pero es mucho más alta la concentración comparada con ambas cepas de *Phaemoniella chlamydospora*.

El AE de citronela alcanza la inhibición total mucho después que las cepas de *Phaemoniella chlamydospora* (300 ppm) (Tabla 25) para los hongos estudiados por Novoa (900 -3000 ppm) (Tabla 27).

En cuanto al AE de clavo (Tabla 27) para *Alternaria* y *Fusarium* alcanzan valores, de tratamiento, equivalentes a ambas cepas de *Phaemoniella chlamydospora* (300 ppm) (Tabla 25). Y para *B. cinerea* y *Penicillium* los valores del tratamiento son de 3000 ppm equivalentes a los de *Neofusicoccum parvum* (Tabla 25)

Los nuevos AE forestales utilizados no tienen grandes posibilidades de acabar con los hongos patógenos, aunque si tienen una buena capacidad de disminuir el crecimiento a

dosis no muy grandes (300 ppm). Sobre todo los AE de cedro y pino frente a *Neofusicoccum parvum* (BV-56) durante cortos y largos periodos (30 y 60 días) (Tabla 22, Tabla 23).

El control biológico requiere una búsqueda exhaustiva de alternativas y numerosos ensayos para que los potenciales agentes de control lleguen a convertirse en métodos viables y por ello, este trabajo se presenta como una primera evaluación de seis posibles alternativas en las condiciones controladas de un laboratorio. Tras los buenos resultados obtenidos sería recomendable realizar nuevos estudios con nuevos aceites esenciales y con los mismos aceites esenciales, como paso siguiente, sobre plantas de vid (*in vivo*). En este caso la evaluación sobre planta es mucho más complicada que con otros patógenos por las características propias de las enfermedades de madera.

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones del trabajo:

- 1- Todos los aceites esenciales estudiados inhiben el crecimiento de los tres patógenos, *Phaemoniella chlamydospora* (PCH-33), *Phaemoniella chlamydospora* (BV-287) y *Neofusicoccum parvum* (BV-56), con dosis desde 30 a 3000 ppm.
- 2- Los aceites esenciales de canela, clavo y citronela inhiben significativamente el crecimiento de *Phaemoniella* a 30 ppm mientras que los otros aceites de abeto, cedro y pino suelen requerir dosis más altas.
- 3- El patógeno *Neofusicoccum parvum* crece más rápido y se requieren dosis elevadas de aceite esencial para reducciones significativas de crecimiento.
- 4- A largo plazo (60 días) solo los aceites de canela, clavo y citronela consiguen inhibir por completo el crecimiento de *Phaemoniella* (a 300 ppm) y *Neofusicoccum* (a 3000 ppm) y por ello serían los recomendables para estudiar in vivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí-Brisach, C., & Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(2), 245–261. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-12662
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., & Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.005>
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F., & García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: A three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 325–329. <https://doi.org/10.1400/14645>
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J., & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115(2), 195–202. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9008-5>
- Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9530-3>

- Arribas, A. (2018). *Evaluación de aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrotrofos in vitro e in vivo*. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/35324>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 446–475). Food Chem Toxicol. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., & Fontaine, F. (2013). Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>
- Bertsch, Christophe, Larignon, P., Farine, S., Clément, C., & Fontaine, F. (2009). The spread of grapevine trunk disease. *Science*, 324(5928), 721. https://doi.org/10.1126/science.324_721a
- Biere, A., Marak, H. B., & Van Damme, J. M. M. (2004). Plant chemical defense against herbivores and pathogens: Generalized defense or trade-offs? *Oecologia*, 140(3), 430–441. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1603-6>
- Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teissedre, P. L., Da Costa, J. P., Guerin-Dubrana, L., & Rey, P. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(2), 262–275. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11578
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, 116(1), 62–80. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.010>
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556. <https://doi.org/10.2307/3761358>
- Cobos, R. (2008). *Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (Vitis vinifera)*. 166.
- Crous, & Gams. (2000). «*Phaeomoniella chlamydospora*» Gen. et Comb. Nov., a Causal Organism of Petri Grapevine Decline and Esca. *Phytopathol. Mediterr*, 39, 112–18.
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C., & Corio-Costet, M.-F. (2016). Grapevine Trunk Diseases. A review. *International Organisation of Vine and Wine, April*, 25. <http://www.oiv.int/public/medias/4650/trunk-diseases-oiv-2016.pdf>
- Gramaje, D., & Armengol, J. (2011). Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. In *Plant Disease* (Vol. 95, Issue 9, pp. 1040–1055). <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0025>

- Gramaje, D., Armengol, J., Colino, M. I., Santiago, R., Moralejo, E., Olmo, D., Luque, J., & Mostert, L. (2009). First report of *Phaeoacremonium inflatipes*, *P. iranianum*, and *P. sicilianum* causing petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 93(9), 964. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0964C>
- Gramaje, David, Urbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102(1), 12–39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>
- Hawthorne, S. B., Rickkola, M. L., Screnius, K., Holm, Y., Hiltunen, R., & Hartonen, K. (1993). Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 634(2), 297–308. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83017-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83017-M)
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
- Jiménez-Carmona, M. M., Ubera, J. L., & Luque De Castro, M. D. (1999). Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *Journal of Chromatography A*, 855(2), 625–632. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00703-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00703-7)
- Legorburu, F. J., Muruamendiaraz, A., & Luque, J. (2014). Las enfermedades de la madera de la vid en planta adulta: aclarando nuestras ideas. *Tierras*, 223, 69–73. http://www.avisosneiker.com/wp-content/uploads/2015/01/Legorburu_et_al_2014_Tierras.pdf
- Li, X. M., Tian, S. L., Pang, Z. C., Shi, J. Y., Feng, Z. S., & Zhang, Y. M. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*, 115(3), 1114–1119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.091>
- Lombard, L., van Der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). Lineages in *Nectriaceae*: Re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 515–532. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14976
- Lucejko, J., Connan, J., Orsini, S., Ribechini, E., & Modugno, F. (2017). Chemical analyses of Egyptian mummification balms and organic residues from storage jars dated from the Old Kingdom to the Copto-Byzantine period. *Journal of Archaeological Science*, 85, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.06.015>
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R., & Garcia-Figueres, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 381–390.
- Luque, Jordi. (2006). «Cryptovalsa ampelina» on Grapevines in N.E. Spain: Identification and Pathogenicity. *Phytopathol. Mediterr*, 45, 101–109. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1838

- Luque, Jordi, Garcia-Figueres, F., Legorburu, F. J., Muruamendiaraz, A., Armengol, J., & Trouillas, F. P. (2012). Species of diatrypaceae associated with grapevine trunk diseases in Eastern Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(3), 528–540. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9953
- Martín. (2017). Molecular and chemical alterations related to esca-leaf symptoms in cv. Tempranillo. *Phytopathologia Mediterranea*, 56, 552–553.
- Martín, L., Cuesta, M. J., & Martín, M. T. (2011). A new report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. hispanicum* causing grapevine trunk disease in Castilla y León, Spain. *New Disease Reports*, 23(1), 27–27. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.027>
- Martín, Laura, Flores, D., Martín, M. T., Nascimento, T., & Rego, C. (2012). Comparison of fungi associated to grapevine trunk diseases in Castilla y León and in Douro. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(2), 427.
- Martín, Laura, & Martín, M. T. (2013a). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protection*, 52, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.023>
- Martín, Laura, & Martín, M. T. (2013b). Multi-gene sequence analysis and phenotypic diversity of *Phaeoacremonium* species isolated from grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2), 343–361. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0247-y>
- Martín, M. T., Martín, L., & Cuesta, M. J. (2011). First Report of *Neofusicoccum mediterraneum* and *N. australe* Causing Decay in *Vitis vinifera* in Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 95(7), 876–876. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-11-0172>
- Martín, M. T., Martín, L., Cuesta, M. J., & García-Benavides, P. (2011). First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 95(3), 361. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0750>
- Martín, M. T., Martín, L., De-Francisco, M. T., & Cobos, R. (2009). First report of *lasidiplodia theobromae* and *Cryptovalsa ampelina* associated with Grapevine Decline from Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 93(5), 545. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0545C>
- Martín, María Teresa, & Cobos, R. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), 18–25. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1854
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., & Crous, P. W. (2006). Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium anamorphs*. *Studies in Mycology*, 54, 1–113. <https://doi.org/10.3114/sim.54.1.1>
- Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83(5), 404–

418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404>

- Novoa Bueno, M., Mediavilla Estébanez, P., & Alves-Santos, F. M. (2018). *Evaluación in vitro e in vivo (uva) de aceites esenciales (canela, clavo, citronela y sándalo) para control biológico de hongos oportunista*. <http://sef.es/sites/default/files/2018-10/sef2018.pdf>
- Pedro, R., Maryline, M.-R., Teresa, N., Alessandro, S., Eliane, M., Fioretti, C., Clément, C., & Cecilia, R. (n.d.). *Reproducing Botryosphaeria dieback foliar symptoms in a simple model system 1 2 3*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1194-RE>
- Peredo, H.A., Palou, E., y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24–32.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76(1), 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Pintos-Varela, C., Redondo-Fernández, V., Aguin-Casal, O., Costas-Inbernón, & Mansilla-Vázquez, J. P. (2017). Characterization of *Botryosphaeriaceae* isolates in grapevine in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(3), 523–524.
- Pitt, W. M., Huang, R., Steel, C. C., & Savocchia, S. (2013). Pathogenicity and epidemiology of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 42(5), 573–582. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0221-3>
- Romanazzi, G., Murolo, S., Pizzichini, L., & Nardi, S. (2009). Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 277–290. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9481-8>
- Rubio, J. J., & Garzón, E. (2011). Las enfermedades de madera de vid como amenaza para el sector vitivinícola. *Winetech*, 2(Noviembre), 18–21.
- Sánchez del Valle, D., Estébanez Mediavilla, P., & Santos Alves, F. M. (2016). *EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE ACEITES ESENCIALES (CANELA Y CLAVO) PARA CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS OPORTUNISTAS*. https://sef.es/sites/default/files/Libro_SEF_2016_Palencia_sin_imagenes_.pdf
- Sosnowski, M. R., Shtienberg, D., Creaser, M. L., Wicks, T. J., Lardner, R., & Scott, E. S. (2007). The influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa dieback* in grapevines. *Phytopathology*, 97(10), 1284–1289. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-10-1284>
- Tegli, S. S. G. B. E. (2000). Sequence Analysis of ITS Ribosomal DNA in Five “*Phaeoacremonium*” Species and Development of a PCR-Based Assay for the Detection of “*P. chlamydosporum*” and “*P. aleophilum*” in Grapevine Tissue. *Sequence Analysis of ITS Ribosomal DNA in Five “Phaeoacremonium” Species and Development of a PCR-Based Assay for the Detection of “P. Chlamydosporum” and “P. Aleophilum” in Grapevine Tissue*, 1000–1016. <https://doi.org/10.1400/57833>

- Tello, M. L., Gramaje, D., Gómez, A., Abad-Campos, P., & Armengol, J. (2010). Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeomoniella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 195–203. <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i1.30>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Travadon, R., Lawrence, D. P., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E., & Baumgartner, K. (2015). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology*, 119(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.002>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 12, Issue 1, pp. 40–53). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Úrbez-Torres, J R, & Gubler, W. D. (2009). *Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevine Cankers in California*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0584>
- Úrbez-Torres, José Ramón. (2011). The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), 5–45. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9316
- Van de Vel, E., Sampers, I., & Raes, K. (2019). A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 3, pp. 357–378). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>
- Villaolmillos Abarquero, C., Santamaria Cantero, R., Arribas Fernandez, A. M., & Alves Santos, F. M. (2018). *Evaluación de aceite esencial de clavo frente a Fusarium oxysporum (in vitro) y de aceite esencial de canela en planta de judía frente a hongos oportunistas*. <http://sef.es/sites/default/files/2018-10/sef2018.pdf>
- Ward, E. W. B. (1986). Biochemical Mechanisms Involved in Resistance of Plants to Fungi. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (pp. 107–131). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-82849-2_9
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. Academic Press New York, 315–322. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1321167](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1321167)
- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L., & Crous, P. W. (2017). Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. *Fungal Biology*, 121(4), 322–346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>