Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control

Carlos Agustí-Brisach, José García-Jiménez y Josep Armengol (Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España).
David Gramaje (Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba, España).

Actualmente, las enfermedades de Petri, brazo negro muerto y pie negro se encuentran entre las patologías más frecuentes en planta joven en España, causando una elevada mortalidad de plantas en viñedos durante los primeros años tras la plantación y graves pérdidas económicas. En los últimos años se ha destacado el papel que el material vegetal producido en viveros puede tener sobre la incidencia y diseminación de estas enfermedades. En este sentido, en este artículo se pretende dar una visión general de la situación actual de la detección de hongos de la madera de la vid en viveros en España, así como de las posibles estrategias de control para combatirlos. Para ello, se muestran los resultados de los trabajos de investigación abordados recientemente en nuestro país, en los que se demuestra que las herramientas y las diferentes labores realizadas durante el proceso de producción de planta de vid injertada tienen un papel muy importante en la diseminación de estas enfermedades. Respecto al control, el objetivo principal debe ser intentar mantener unos niveles bajos de estos patógenos. La combinación de diferentes estrategias de control, como el uso de fungicidas y la termoterapia con agua caliente, junto con un material vegetal de partida (plantas madre) libre de estos patógenos, es actualmente la mejor alternativa para obtener plantas injertadas de vid de la mejor calidad fitosanitaria posible.

Problemática actual de los hongos de la madera de la vid en viveros

Tradicionalmente, las enfermedades de la madera de la vid se han asociado a viña adulta. La yesca y la eutipiosis eran bien conocidas por los viticultores y su control se realizaba principalmente mediante la aplicación de arsenito sódico y podas sanitarias para eliminar madera muerta, que se podían complementar con la aplicación de otros fungicidas. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, se ha constatado un incremento general de la incidencia de las enfermedades de la madera en todo el mundo, siendo éstas especialmente graves en nuevas plantaciones. Además, se han descrito nuevas enfermedades como la enfermedad de Petri o el brazo negro muerto, y se ha mejorado el conocimiento sobre otras como el pie negro (García-Jiménez y col., 2010; Gramaje y Armengol, 2011, Agustí-Brisach y Armengol, 2013). De hecho, actualmente estas tres enfermedades son las más frecuentes en planta joven en España, causando una elevada mortalidad de plantas en viñedos durante los primeros años tras la plantación y graves pérdidas económicas (Agustí-Brisach y col., 2013a). Entre los factores que pueden haber contribuido al aumento de la incidencia de estas enfermedades se han indicado los cambios en las prácticas culturales en los viñedos, la prohibición en el uso del arsenito sódico, reemplazado por fungicidas menos efectivos, y una escasa protección de las heridas de poda.

La enfermedad de Petri suele comenzar afectando a la parte basal del patrón, colonizando y necrosando los vasos xilemáticos, y está causada por hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium*, y las especies *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*. La enfermedad del pie negro se caracteriza por causar una necrosis generalizada de la base del patrón y una reducción del sistema radicular, siendo causada por especies pertenecientes a los géneros *Campylocarpon*, "*Cylindrocarpon*", *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria*. La enfermedad del brazo negro muerto, causada por especies de la familia Botryosphaeriaceae, se caracteriza por producir necrosis sectoriales de la madera de los brazos o del tronco principal de las plantas. Los hongos que causan las enfermedades de Petri y del pie negro de la vid son habitantes comunes del suelo, siendo capaces de infectar a las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo. Además, los hongos que causan la enfermedad de Petri, junto a los que causan el brazo negro muerto, son capaces también de penetrar en las plantas por las heridas de poda.

Los hongos de la madera son frecuentes en campo afectando a vid y también a otros hospedantes. No obstante, en los últimos años numerosas investigaciones han destacado el papel que el material vegetal producido en viveros puede tener sobre su incidencia y diseminación (Gramaje y Ar-

mengol, 2011). En todo el mundo se han abordado estudios para determinar la presencia de hongos de la madera en viveros de vid y entender mejor su epidemiología, ya que las técnicas tradicionales de producción de planta injertada incluyen fases que se consideran puntos potenciales de infección: la hidratación en balsas, el desyemado de estaquillas, el injerto, el proceso de inducción del callo basal en las plantas recién injertadas y el enraizamiento de éstas en campo (Figura 1) (Gramaje y Armengol, 2011). Estos estudios han demostrado que las labores de producción de planta injertada, junto con una baja protección sanitaria en los viveros, pueden tener un efecto negativo sobre la calidad de las vides producidas.

En este sentido, en los últimos años se ha realizado un seguimiento de las diferentes fases del proceso de producción de planta injertada y del suelo de campos de viveros en nuestro país para determinar su papel en la infección de las plantas, con el objetivo final de establecer estrategias de control en vivero que permitan mejorar la calidad sanitaria del material de propagación. Este artículo presenta una visión general de los resultados obtenidos.

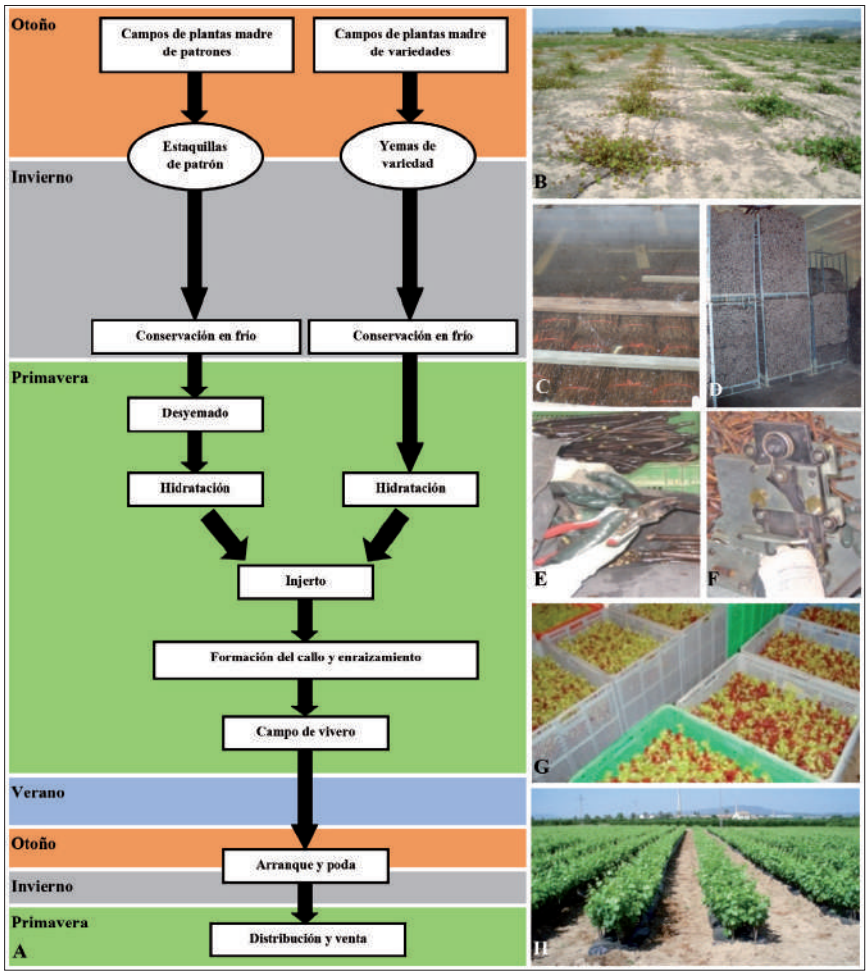

Figura 1. A) Esquema de las fases de la producción de planta injertada en viveros de vid. B) Campo de plantas madre. C) Balsas de hidratación. D) Conservación en frío. E) Desyemado. F) Máquina de injertar. G) Formación del callo y enraizamiento. H) Campo de vivero.

Detección de los hongos de la madera de la vid en las diferentes fases del proceso de producción de planta injertada

Se han realizado prospecciones periódicas en viveros de vid en España, tomando muestras en cada una de las fases que componen el proceso de producción de planta de vid injertada. Mediante técnicas clásicas de aislamiento fúngico en medio de cultivo, así como mediante el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), multiplex-nested PCR o PCR a tiempo real se han conseguido detectar diferentes especies de hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid. En la Tabla 1 se muestra un resumen de todas las especies detectadas en cada una de las fases muestreadas.

Detección de hongos de la madera en plantas madre

Mediante aislamiento en medio de cultivo, en las plantas madre de vivero se detectaron las especies *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* y *Phaeomoniella chlamydospora*, que causan la enfermedad de Petri. En cuanto a los hongos causantes de la enfermedad del pie negro, éstas se identificaron a nivel de género, confirmándose la presencia de especies de *Ilyonectria*. Finalmente, respecto al brazo negro muerto, las especies detectadas en plantas madre fueron: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum australe*, *N. mediterraneum*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme* (Aroca y col., 2006; 2010; Giménez-Jaime y col., 2006).

Detección de hongos de la madera en las diferentes fases del proceso de producción de planta injertada

Se muestrearon las balsas de hidratación en viveros (tomando muestras de agua de dichas balsas), las tijeras de poda utilizadas para el desyemado, así como las máquinas injertadoras tras una jornada de trabajo, limpiando estas herramientas con agua destilada estéril a la que se le había añadido Tween-20 al 0,2%, y depositando el líquido de lavado en recipientes de plástico herméticos. Por último, también se recogieron muestras de la turba tras el proceso de inducción del callo.

Mediante el uso de medio de cultivo semi-selectivo y/o con la técnica de multiplex-nested PCR, se detectaron el complejo *Ilyonectria macrodidyma* y las especies *Ca. luteo-olivaea*, *I. liriodendri*, *Pm. aleophilum*, *Pm. parasiticum* y *Pa. chlamydospora* en muestras procedentes de las cuatro fases muestreadas (Aroca y col., 2010; Gramaje y col., 2011, Agustí-Brisach y col., 2013c).

Respecto a los hongos causantes del brazo negro muerto, hasta la actualidad no se habían realizado estudios que determinen la presencia de estos patógenos en las distintas fases del proceso de producción de planta injertada en España.

Detección de hongos de la madera en planta injertada antes y después del proceso de enraizamiento en campo de vivero

Tras el proceso de inducción del callo y justo antes de plantar en campo las plantas injertadas de vid,

se muestrearon plantas de diferentes combinaciones de patrón y variedad en numerosos viveros. Tras un ciclo de cultivo en campos de enraizamiento, se prospectaron de nuevo, muestreando esta vez las plantas ya enraizadas procedentes de las mismas partidas.

Mediante el uso de técnicas de aislamiento fúngico en medio de cultivo, en las plantas injertadas muestreadas antes de plantar en el campo de enraizamiento, se detectaron *Pm. aleophilum*, otras especies de *Phaeoacremonium* y *Pa. chlamydospora* (Aroca y Raposo, 2005), la especie *I. torresensis* (Agustí-Brisach y col., 2013c) y *D. seriata* y otras especies de la familia Botryosphaeriaceae (Aroca y Raposo, 2005). Respecto a las plantas muestreadas tras el proceso de enraizamiento en campo, se detectaron las especies *Pm. aleophilum* y *Pm. parasiticum* (Aroca y Raposo, 2005); *I. liriodendri*, *I. novozelandica* e *I. torresensis* (Agustí-Brisach y col., 2013c) y *B. dothidea*, *D seriata* y *N. parvum* (Aroca y Raposo, 2005).

En las plantas muestreadas antes de la plantación y tras el proceso de enraizamiento también se estudió la detección de hongos de la madera mediante la técnica molecular multiplex-nested PCR que confirmó la presencia del complejo *I. macrodidyma* y la especie *I. liriodendri* (Agustí-Brisach y col., 2013c). Es importante destacar que mediante el uso de esta técnica se obtuvieron un número mayor de muestras positivas que con la técnica clásica de aislamiento fúngico.

En general, en todos los casos estudiados e independientemente de la técnica de detección utilizada, los resultados obtenidos indicaron que tras un ciclo de cultivo en los campos de enraizamiento de vivero se produce un incremento considerable de las infecciones causadas por hongos de la madera.

Detección de hongos de la madera en los suelos de campos de plantas madre y de enraizamiento de vivero

Para estudiar el papel del suelo en la epidemiología de estas enfermedades se utilizaron tres técnicas diferentes: siembra de plantas trampa, prospección y estudio de malas hierbas, y detección y cuantificación de hongos mediante las técnicas de multiplex-nested PCR y PCR a tiempo real.

En cuanto al estudio realizado mediante plantas trampa, en un campo de plantas madre y en un campo de enraizamiento de vivero se plantaron lotes de plántulas de vid obtenidas de semillas. Tras uno o dos ciclos de cultivo, en estas plantas se detectaron las siguientes especies de hongos: *Ca. luteo-olivacea*, *Pm. aleophilum*, *Pm. parasiticum*, *Pa. chlamydospora*, *I. alcacerensis*, *I. macrodidyma*, *I. novozelandica* e *I. torresensis*. Las especies asociadas al pie negro de la vid se aislaron con mucha mayor frecuencia que las causantes de la enfermedad de Petri (Agustí-Brisach y col., 2013b).

Las malas hierbas se recogieron tanto en campos de plantas madre como en campos de enraizamiento. Al igual que ocurrió en el estudio de plantas trampa, la frecuencia de aislamiento de los hongos asociados a la enfermedad del pie negro fue mucho mayor que la de los hongos causantes de la enfermedad de Petri. De estos últimos, sólo se obtuvieron algunos aislados de *Ca. luteo-olivacea*. Con una selección de los aislados obtenidos se realizó un test de patogenicidad a vid mediante el que se demostró su patogenicidad al cultivo (Agustí-Brisach y col., 2011).

Las técnicas moleculares de multiplex-nested PCR y PCR a tiempo real mostraron una elevada presencia de los hongos asociados a la enfermedad del pie negro en los suelos de viveros, siendo éstos más abundantes en los campos de plantas madre. El complejo *I. macrodidyma* se detectó en la mayoría de las muestras de suelo evaluadas mediante multiplex-nested PCR, mientras que la especie *I. liriodendri* se detectó con mucha menor frecuencia (Agusti-Brisach y col., 2013d).

FASES DE PRODUCCIÓN	ESPECIES FÚNGICAS: Enfermedad de Petri	Pie negro	Brazo negro muerto
Plantas madre	*Phaeoacremonium aleophilum* *Pm. parasiticum* *Phaeomoniella chlamydospora*	*Dyonectria* spp.	*Botryosphaeria dothidea* *Diplodia seriata* *Lasiodiplodia theobromae* *Neofusicoccum australe* *N. mediterraneum* *N. parvum* *N. vitifusiforme*
Balsas de hidratación	*Cadophora luteo-olivacea* *Phaeoacremonium* spp	*Dyonectria liriodendri* Complejo *I. macrodidyma*	NE[1]
Tijeras de poda utilizadas para el desyemado	*Ca. luteo-olivacea* *Pm. aleophilum* *Pm. parasiticum*	*I. liriodendri* Complejo *I. macrodidyma*	NE
Máquinas injertadoras	*Ca. luteo-olivacea* *Phaeoacremonium* spp. *Pa. chlamydospora*	Complejo *I. macrodidyma*	NE
Turba después de la fase de inducción del callo	*Phaeoacremonium* spp. *Pa. chlamydospora*	*I. liriodendri* Complejo *I. Macrodidyma*	NE
Planta injertada antes de plantar en campo de enraizamiento de vivero	*Phaeoacremonium* spp *Pm. aleophilum* *Pa. chlamydospora*	*I. liriodendri* Complejo *I. macrodidyma*	Botryosphaeriaceae spp. *D. seriata*
Planta injertada tras el proceso de enraizamiento en campo de vivero	*Pm. aleophilum* *Pm. parasiticum*	*I. liriodendri* *I. novozelandica* *I. torresensis*	*B. dothidea* *D. seriata* *N. parvum*
Suelos			
-Campos de plantas madre	*Ca. luteo-olivacea* *Pm. aleophilum* *Pa. chlamydospora*	*I. liriodendri* Complejo *I. macrodidyma*	NE
-Campos de enraizamiento	*Ca. luteo-olivacea* *Pm. aleophilum* *Pm. parasiticum*	*I. liriodendri* Complejo *I. macrodidyma*	NE

(De Agustí-Brisach *et al.*, 2011, 2013b, c, d; Aroca y Raposo, 2005; Aroca *et al.*, 2006, 2010; Gimenez-Jurado *et al.*, 2006; Guarnaccia *et al.*, 2011)

[1] NE = No estudiado

Tabla 1. Hongos asociados a las enfermedades de Petri, pie negro y brazo negro muerto, detectados en viveros de vid en España.

Estrategias de control

Una vez confirmada la presencia de hongos asociados a las enfermedades de la madera en las distintas fases de producción de planta injertada, así como la infección de las plantas al final del proceso, resulta de la mayor importancia la implementación de prácticas de manejo consistentes y efectivas que minimicen el riesgo de infección por estos hongos en viveros de vid. Hasta ahora no se dispone de estrategias de control que consigan erradicar los hongos de la madera en plantaciones establecidas, por lo que el objetivo principal debe ser intentar mantener unos niveles bajos de estos patógenos mejorando la calidad sanitaria del material de propagación.

La aplicación de fungicidas o agentes de control biológico, principalmente en las fases de hidratación y de inducción del callo, y/o durante la fase de enraizamiento en campo, podría servir para reducir las infecciones causadas por estos hongos. Además, muchos estudios se han centrado en la evaluación de tratamientos por termoterapia con agua caliente, entendiéndose esta técnica como una alternativa con gran potencial para el control de hongos de la madera y otros patógenos en el proceso de producción de planta injertada.

En estudios llevados a cabo en otros países como Australia, California o Sudáfrica, se ha observado

que la inmersión de barbados de patrones en estado latente en agua caliente a 50ºC durante 30 min podría ser suficiente para eliminar estos patógenos del material vegetal, siendo el uso de esta técnica una práctica habitual en viveros de estos países (Gramaje y Armengol, 2011). Sin embargo, en España esta técnica apenas se utiliza.

En los últimos años se han realizado varios estudios con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de tratamiento por termoterapia con agua caliente a planta de vid injertada para su implementación en nuestro país (Gramaje y col., 2008, 2009 y 2010a; Gramaje y Armengol 2012). En primer lugar, se abordaron estudios *in vitro* con el objetivo de conocer la sensibilidad de los hongos causantes de la enfermedad de Petri y del pie negro de la vid a los tratamientos de termoterapia con agua caliente evaluando el crecimiento miceliar y la esporulación de aislados de *Ca. luteo-olivacea*, *Pm. aleophilum*, *Pm. parasiticum* y *Pa. chlamydospora*; e *I. liriodendri* y especies del complejo *I. macrodidyma* a diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de tratamiento. Los resultados obtenidos demostraron que las especies pertenecientes al género *Ilyonectria* son mucho más sensibles a los tratamientos que las especies asociadas a la enfermedad de Petri, sugiriendo que tratamientos a 50ºC durante 30 min serían suficientes para el control de estas especies, mientras que para el control de las especies causantes de la enfermedad de Petri sería necesario

Figura 2. Plantación comercial de vid con plantas tratadas por termoterapia con agua caliente a 53ºC durante 30 minutos en la que, tras cinco años de cultivo, no se han observado diferencias significativas respecto al desarrollo de las mismas, producción de uva y calidad del mosto entre plantas tratadas (izquierda) y no tratadas (derecha).

MÁSTER
interuniversitario en
Sanidad Vegetal

Curso 2014-2015

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Universidad Politécnica de Cartagena
UNIVERSITAS Miguel Hernández
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Título propio de Máster de 60 créditos destinado a postgraduados que quieren especializarse en materias de Protección de Cultivos. Se imparte en su mayoría "on-line", con dos semanas presenciales al final del curso.

Página web:
www.mastersanidadvegetal.blogs.upv.es

Contacto:
Attn. Ferran Garcia Marí/ Antonia Soto Sánchez
Máster en Sanidad Vegetal
Instituto Agroforestal Mediterráneo
Edificio 8E, escalera F, 2º piso
Universitat Politècnica de València
Camí de Vera s/n
46022 – Valencia (España)
E-mail del Máster: msv@upv.es

realizar tratamientos a temperaturas algo más elevadas.

Posteriormente se evaluó cómo podía afectar el tratamiento por termoterapia con agua caliente a plantas de vid, tanto sanas como inoculadas artificialmente con aislados de *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora*. Estos trabajos demostraron que los tratamientos con agua caliente por encima de 50ºC son capaces de reducir considerablemente la presencia de estos patógenos en el material de propagación de vid. Concretamente, a 53ºC se elimina completamente la presencia de *Pa. chlamydospora*, reduciéndose notablemente la presencia de *Pm. aleophilum* (Gramaje *et al*., 2009). En este sentido, se ha establecido en la provincia de Albacete una plantación comercial de vid con plantas tratadas por termoterapia con agua caliente a 53ºC durante 30 minutos en la que tras cinco años de cultivo no se han observado diferencias significativas entre plantas tratadas y no tratadas respecto al desarrollo de las mismas, producción de uva y calidad del mosto (Figura 2) (Gramaje y col., 2013).

Otro aspecto a tener en cuenta es la sensibilidad de los patrones de vid a los hongos de la madera. Un estudio de evaluación en campo de diferentes patrones inoculados con hongos de la madera demostró que, en general, el patrón 161-49C era más tolerante que otros patrones como 110R y 140Ru (Gramaje y col., 2010b). No obstante, se requieren más estudios para determinar el potencial que el uso de diferentes materiales vegetales ofrece como estrategia de manejo.

Consideraciones finales

Los estudios realizados hasta el momento demuestran que las herramientas y las diferentes labores realizadas durante el proceso de producción de planta de vid injertada tienen un papel muy importante en la dispersión de las enfermedades de la madera de la vid, constatándose la presencia de infecciones causadas por hongos de la madera en el material vegetal de propagación. La situación en nuestro país es similar a la descrita en el resto de países productores de vid. Desafortunadamente, en la actualidad no existen medidas de control que permitan la completa erradicación de estos hongos. En este sentido, la combinación de estrategias de control como el uso de fungicidas o agentes de control biológico y la termoterapia, junto con un material vegetal de partida (plantas madre) libre de estos patógenos es, a día de hoy, la mejor alternativa para obtener plantas injertadas de vid de la mejor calidad fitosanitaria posible. Tras el establecimiento de la plantación, deberá ser el agricultor el encargado de mantener la sanidad de estas plantas mediante la implementación de las técnicas de manejo más adecuadas para el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Agustí-Brisach C. y Armengol J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. Phytopathologia Mediterranea 52 (2), 245-261.

Agustí-Brisach C., Gramaje G., Armengol J. y García-Jiménez J. (2013a). Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. Tierras 202, 108-113.

Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jiménez J. y Armengol J. (2013b). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. Plant and Soil 364, 5-13.

Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jiménez J. y Armengol J. (2013c). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. European Journal of Plant Pathology 137, 103-112.

Agustí-Brisach C., Gramaje D., León M., García-Jiménez J. y Armengol J. (2011). Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. Plant Disease 95, 803-810.

Agustí-Brisach C., Mostert L. y Armengol J. (2013d). Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex, nested PCR and real-time PCR. Plant Pathology, 63, 316-322.

Aroca A., García-Figueres F., Bracamonte L., Luque J. y Raposo R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. European Journal of Plant Pathology 115, 195-202.

Aroca A., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez J. y Raposo R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. European Journal of Plant Pathology 126, 165-174.

Aroca A. y Raposo R. (2005). Occurrence of fungi associated with Petri disease in bench-grafted vines. Phytopathologia Mediterranea 44, 90.

García-Jiménez J., Raposo R. y Armengol J. (2010). Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Pgs.161-173 en: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí, eds. Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado. SEF-PHYTOMA-España. Valencia

Giménez-Jaime A., Aroca A., Raposo R., García-Jiménez J. y Armengol J. (2006). Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. Journal of Phytopathology 154, 598-602.

Gramaje D., Alaniz S., Abad-Campos P., García-Jiménez J. y Armengol J. (2010a). Effect of hot-water treatments *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. Annals of Applied Biology 156, 231-241.

Gramaje D. y Armengol J. (2012). Effects of hot-water treatment, post-hot-water-treatment cooling and cold storage on the viability of dormant grafted grapevines under field conditions. Australian Journal of Grape and Wine Research 18, 158-163.

Gramaje D. y Armengol J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. Plant Disease 95, 1040-1055.

Gramaje D., Armengol J., Salazar D,. López-Cortés I. y García-Jiménez J. (2009). Effect of hot-water treatments above 50ºC on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. Crop Protection 28, 280-285.

Gramaje D., García-Jiménez J. y Armengol J. (2010b). Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. American Journal of Enology and Viticulture 61, 512-520.

Gramaje D., García-Jiménez J. y Armengol J. (2008). Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatmens *in vitro*. Annals of Applied Biology 153, 95-103.

Gramaje D., Mañas F., Lerma M.L., Muñoz R.M., García-Jiménez J. y Armengol J. (2013). Effects of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and quality of must. Australian Journal of Grape and Wine Research 20, 144-148..

Gramaje D., Mostert L., y Armengol J. (2011). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii isolates* obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. Phytopathologia Mediterranea 50, S112-S126.