

Susceptibilidad varietal de almendros a *Phomopsis amygdali* en Mallorca, en condiciones de laboratorio y de campo

**Marina Montesinos,
Diego Olmo**

Serveis de Millora
Agrària i Pesquera
(SEMILLA). Govern de
les Illes Balears.

Andreu Juan

Servei d'Agricultura.
Conselleria de Medi
Ambient, Agricultura
i Pesca. Govern de les
Illes Balears.



Figura 1. Proceso de inoculación en campo. A) Realización de la herida con un sacabocados B) Herida realizada C) Inóculo D.1) Inoculación con *P. amygdali* D.2) Inoculación control E) Herida con inóculo sellada.

El almendro es uno de los cultivos tradicionales más importantes de Mallorca, siendo el chancro causado por el hongo *Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla una de las enfermedades más importantes de este cultivo en la isla, generando considerables pérdidas de producción. Esta enfermedad provoca chancros en brotes y ramas del año que habitualmente se inician alrededor de las yemas, ocasionando la seca del brote a partir de ese punto. Como respuesta a esta problemática, muchas parcelas de la isla han empezado a plantar variedades a priori menos sensibles a la enfermedad, substituyendo a otras que a lo largo de los años se han manifestado como muy sensibles en las condiciones de Mallorca. Para poder encontrar variedades que toleren mejor las infecciones por este hongo, se estudiaron 17 variedades de almendro en condiciones de laboratorio, inoculándolas con una solución de esporas (10^6 esporas/ml) y evaluando los resultados como número de yemas afectadas por chancros y porcentaje de longitud ocupada por éstos respecto a la total del brote, diez días después de la inoculación. Además, se realizó un ensayo en condiciones de campo en una finca experimental que contaba con catorce variedades, inoculando en este caso los brotes con discos de micelio de *Phomopsis amygdali*, y evaluando los resultados como longitud de la necrosis interna formada bajo el punto de inoculación, transcurridas cinco semanas. En laboratorio las variedades más tolerantes al hongo fueron 'Pons', 'Jordi', 'Tarraco', 'Glorieta' y 'Vivot', tres de ellas mallorquinas. Mientras que las más susceptibles fueron 'Penta', 'Belona', 'Masbovera' y 'Lauranne'. En campo, las variedades que se mostraron más tolerantes fueron 'Tarraco', 'Ferragnes', 'Marinada' y 'Marta', y las más susceptibles fueron 'Penta', 'Vairo', 'Mardía' y 'Lauranne'.

Phomopsis amygdali (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla) o *Diaporthe amygdali* (Delacr.) Udayanga (Crous y K. Hyde), según se refiere a su fase asexual o sexual, respectivamente, es uno de los hongos causantes de chancros en las yemas de brotes y ramas del año en almendros, relacionados con las enfermedades más importantes en el área mediterránea, siendo uno de los hongos fitopatógenos más importantes en este cultivo. Forma picnidios subepidérmicos oscuros, que fructifican formando cirros, produciendo desecamientos de flores, yemas, brotes y hojas. El hongo y la enfermedad que ocasiona se extienden por todo el mundo, ha sido citado, entre otros países, en Brasil, Canadá, China, Grecia, Italia, Portugal, España, Sudáfrica y Estados Unidos (Tuset y Portilla, 1989; Mostert y col., 2001; Chi y col., 2007; Rhouma y col., 2008; Diogo y col., 2010).

La enfermedad que causa *Phomopsis amygdali* en los almendros es una de las más importantes del cultivo en Mallorca y el almendro responde a ella con diferentes grados de susceptibilidad varietal (Vargas y Miarnau, 2011), por este motivo, se estudió cómo reaccionan distintas variedades de almendro a este hongo, para poder realizar una elección más acertada en las nuevas plantaciones.

Material y métodos

Ensayo en condiciones de laboratorio

Para la realización de este ensayo se utilizaron 17 variedades de almendro, concretamente tres variedades autóctonas mallorquinas, 'Jordi', 'Pons' y 'Vivot'; tres variedades obtenidas en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), 'Belona', 'Mardía' y 'Soleta'; seis variedades obtenidas en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Cataluña (IRTA), 'Masbovera', 'Constantí', 'Glorieta', 'Marinada', 'Tarraco' y 'Vairo'; tres obtenidas en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia, 'Antoñeta', 'Marta' y 'Penta' y dos obtenidas en el Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA) de Francia, 'Ferragnes' y 'Lauranne'. Para obtener el inóculo se tomaron muestras de brotes de almendros

Variedad	Tratamiento		Control	
	Nº medio de yemas afectadas por brote	Error estándar	Nº medio de yemas afectadas por brote	Error estándar
Penta	6,50	± 0,50	0,70	± 0,52
Lauranne	5,80	± 0,44	0,00	-
Masbovera	5,50	± 0,40	0,00	-
Belona	5,20	± 0,66	0,2	± 0,20
Ferragnes	4,90	± 0,62	0,00	-
Antoñeta	4,40	± 0,64	0,00	-
Mardía	3,70	± 0,68	0,30	± 0,21
Vairo	3,70	± 0,82	0,00	-
Constantí	3,30	± 0,76	0,00	-
Marta	2,60	± 0,45	0,00	-
Soleta	2,00	± 0,52	0,00	-
Marinada	2,00	± 0,77	0,00	-
Vivot	1,50	± 0,48	0,00	-
Glorieta	1,40	± 0,22	0,00	-
Tarraco	1,30	± 0,39	0,00	-
Jordi	0,90	± 0,31	0,00	-
Pons	0,00	-	0,00	-

Tabla 1. Resultados de la inoculación en laboratorio mediante solución de esporas: comparación del número medio de yemas afectadas, con presencia de chancros, por brote *Phomopsis amygdali* y su error estándar

con presencia de chancros recientes de varias parcelas de Mallorca y se introdujeron en cámara húmeda para favorecer su esporulación. A partir de los cirros generados se preparó una solución en agua destilada estéril de 10^6 conidias/ml, como en el trabajo de Dai y col. (2012).

Se prepararon veinte brotes del año de cada variedad, diez brotes para inocular y diez como control, que incluyeran siete yemas cada uno. Las longitudes variaron entre 10 y 20 cm en general. Previa desinfección superficial con lejía al 10% en agua destilada estéril y dos posteriores lavados en agua destilada estéril, se inocularon por inmersión durante veinte segundos en la solución de conidias en agitación continua y posteriormente se colocaron en cámara húmeda para observar la evolución de las infecciones. Los brotes control se manipularon del mismo modo, salvo que la inmersión se produjo en agua destilada estéril sin conidias.

El ensayo se evaluó transcurridos diez días después de las inoculaciones (Figura 2), contando el número de yemas afectadas, así como calculando el porcentaje de longitud ocupada

por los chancros generados respecto a la longitud total de los brotes. Asimismo, se comprobaron los postulados de Koch aislando el hongo *P. amygdali*, y comprobando, de la misma manera, que en las muestras control no se aislaba ningún hongo.

Ensayo en condiciones de campo

El segundo ensayo se realizó en condiciones de campo. Para ello se utilizó una plantación experimental de la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca ubicada en el término municipal de Palma (Xorriego). Este campo experimental se implantó el año 2014 y 2015 y disponía de catorce variedades, siendo las mismas variedades que en el ensayo en condiciones de laboratorio excepto las variedades autóctonas 'Pons', 'Jordi' y 'Vivot'. Cada variedad estaba representada por un total de doce árboles, con cuatro repeticiones distribuidas en tres bloques al azar.

La inoculación con *Phomopsis amygdali* se realizó el 29 de septiembre de 2016, en tres árboles por variedad y bloque, descortezando discos de 5 mm en brotes del año con ayuda de un sacabocados, colocando pos-

teriormente un disco de micelio del mismo diámetro, con un cultivo del hongo de dos semanas de en medio de cultivo PDA (patata dextrosa agar) en contacto con el tejido interno del brote y sellándolo con Parafilm®. De la misma manera se procedió también en los árboles control, uno por variedad y bloque, colocando un disco en este caso de PDA estéril (Figura 1).

A las cinco semanas se cortaron los brotes inoculados a unos 15 cm por debajo del punto de inoculación y se trasladaron al laboratorio, donde se retiró la corteza con bisturí para poder medir las longitudes de las necrosis internas (Figura 5).

Una vez medidas las necrosis, se eligieron brotes de distintas variedades comprobando que se aislaba *Phomopsis amygdali* en las inoculadas y no en las muestras control, siguiendo los postulados de Koch.

Resultados y discusión

Resultados y discusión en condiciones de laboratorio

Uno de los resultados obtenidos a partir de los datos en condiciones de laboratorio fue el número de yemas afectadas por brote, que se muestra en la Tabla 1. Se puede observar que los tratamientos control fueron significativamente diferentes a los inoculados, siendo siempre menor a una yema afectada. Asimismo, podemos observar que las variedades donde se dieron más infecciones fueron 'Penta', 'Lauranne', 'Masbovera', 'Belona', 'Ferragnes' y 'Antoñeta', mientras que las variedades 'Vivot', 'Glorieta', 'Tarraco', 'Jordi' se han manifestado más tolerantes a las infecciones, y la variedad 'Pons' ha resultado ser resistente en nuestro ensayo.

Si comparamos estos resultados con los del porcentaje de longitud ocupada por los chancros expresado en la Figura 3 como porcentaje de afección, podemos ver que no todas aquellas variedades que presentaron un mayor número de yemas afectadas mostraron un mayor porcentaje de afección, sino que en algunos casos presentaron un menor número de yemas afectadas con una mayor evolución de la afección como por ejemplo las variedades 'Belona' y 'Vairo'. En el caso de afección del brote, se realizaron pruebas ANOVA para



Figura 2. Inoculaciones en laboratorio mediante solución de esporas: brotes inoculados con conidias de *P. amygdali* (arriba) y control (abajo) de la variedad 'Penta', transcurridos diez días de la inoculación.

comparar diferencias utilizando el test de Duncan de comparaciones múltiples para establecer diferencias significativas entre variedades.

Además, se puede ver que es difícil clasificar las variedades en distintos grupos de susceptibilidad, ya que, según el análisis estadístico, muchas comparten grupo. En cualquier caso, la variedad 'Pons' se manifestó como potencialmente resistente y mostrando diferencias significativas con las demás variedades, seguida de las variedades 'Jordi' y 'Tarraco'. Por otro lado, se observa que la variedad más sensible es 'Penta', sin mostrar diferencias significativas con 'Belona', ni ésta con 'Masbovera'.

Con estos datos podemos hacer una clasificación aproximada según el porcentaje de afección. Como variedades muy tolerantes podemos encontrar las que presentan un porcentaje de afección menor al 20%, siendo las variedades 'Pons', 'Jordi', 'Tarraco', 'Glorieta' y 'Vivot'. Entre las tolerantes, con un porcentaje de afección entre el 20% y el 40%, están las variedades 'Constantí', 'Marinada', 'Soleta', 'Marta' y 'Antoñeta'. Las variedades susceptibles al hongo, con un rango de entre 40-60%, son 'Ferragnes', 'Mardía', 'Vairo', 'Lauranne' y 'Masbovera'. Y, finalmente, las variedades muy susceptibles, con más de un 60% de afección, son 'Belona' y 'Penta'.

Respecto al estudio de estas variedades realizado por Vargas y Miarnau (2011), encontramos algunas similitudes como por ejemplo la clasificación de la variedad 'Tarraco' como muy tolerante o la variedad 'Marinada' como tolerante. Pero también encontramos diferencias importantes en variedades como 'Masbovera', 'Vairo' y 'Glorieta', que las clasifican como muy tolerantes, tolerantes o de tolerancia media respectivamente y en nuestro estudio 'Masbovera' y 'Vairo' se mostraron como susceptibles y la variedad 'Glorieta' como muy tolerante.

Por último, cabe destacar que las tres variedades mallorquinas ensayadas están entre las más tolerantes a la enfermedad, aunque lamentablemente no podemos comparar estos resultados con otros estudios donde no se incluyeron (Vargas y Miarnau 2011), ni tampoco estaban presentes en la finca experimental donde se realizó el ensayo de campo, cuyos resultados se presentan a continuación.

Resultados y discusión en condiciones de campo

Los datos de las longitudes de las lesiones internas tras la inoculación del ensayo en campo se analizaron obteniendo, como se puede ver en la Figura 4, menores diferencias entre las variedades estudiadas y un menor número de grupos. La mayoría de ellas no presentaron diferencias significativas respecto a la demás, pudiendo ser causado por el efecto de la parcela, el año, las condiciones climáticas o el método de inoculación utilizado.

Realmente, podemos diferenciar tres grupos: aquellas variedades más tolerantes ('Tarraco', 'Ferragnes', 'Marinada', 'Marta' y 'Soleta'), las de mayor susceptibilidad ('Lauranne', 'Mardía', 'Vairo' y 'Penta'), y variedades intermedias ('Masbovera', 'Glorieta', 'Belona', 'Constantí' y 'Antoñeta').

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el estudio de Vargas y Miarnau (2011), se observa que la variedad 'Ferragnes' no ha mostrado tener un comportamiento muy susceptible en nuestro ensayo de campo, sino al contrario, se clasifica como una de las variedades de mayor tolerancia (Figura 4), mientras que en el estudio de estos autores se mostró como muy susceptible. Otras variedades que muestran resultados dife-

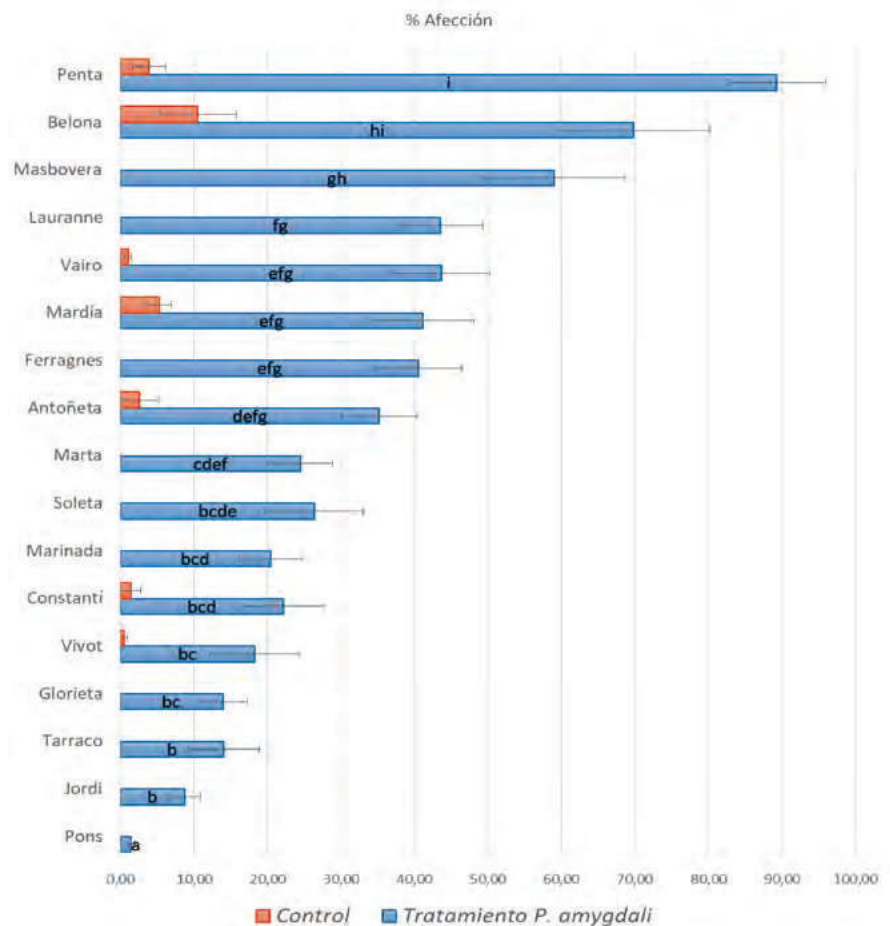


Figura 3. Resultados de las Inoculaciones en laboratorio mediante solución de esporas: representación gráfica de los porcentajes de afección en control y tratamiento. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($P<0,05$) entre los porcentajes según el test de Duncan.

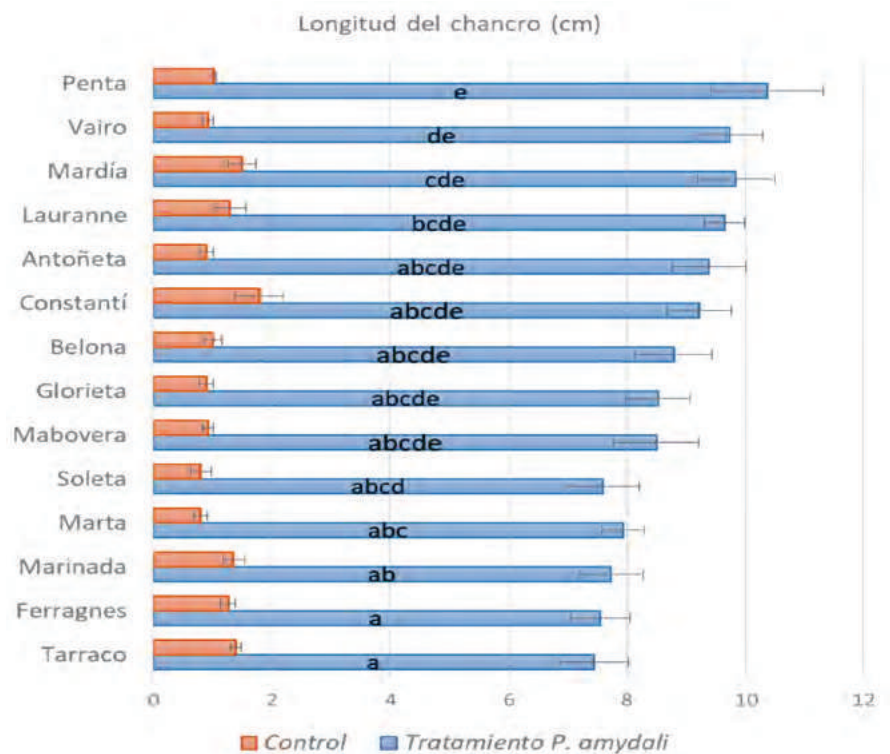


Figura 4. Resultados de las inoculaciones en campo mediante discos de micelio: representación gráfica de la longitud de la lesión interna en centímetros de las muestras control y tratamiento. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($P<0,05$) en las longitudes según el test de Duncan.



Figura 5. Inoculaciones en campo mediante discos de micelio: brotes inoculados (derecha) y control (izquierda) de la variedad 'Penta', transcurridas 5 semanas de la inoculación, y descortezados para mostrar la necrosis interna a partir del punto de inoculación (línea de puntos).

/ Las tres variedades mallorquinas ensayadas están entre las más tolerantes a la enfermedad /

rentes son 'Marta' y 'Masbovera' que en nuestro estudio se clasifica como tolerante y de susceptibilidad media, y en cambio en el trabajo Vargas y Miarnau (2011) se clasifican como susceptible y muy tolerante respectivamente. En algunas variedades sí que hemos encontrado similitudes en tolerancia, como el caso de 'Tarraco' y 'Marinada', y en susceptibilidad, como el caso de 'Lauranne'.

Discusión entre ensayos

Si comparamos los resultados obtenidos en los dos ensayos, en el de laboratorio y en el de campo, podemos ver que algunas variedades coinciden en cuanto a su comportamiento, como sería el caso de la variedad 'Penta', que muestra ser la más susceptible en ambos. También muestran similitud en su clasificación las varie-

dades 'Lauranne', 'Marta', 'Marinada' y 'Tarraco'. En el resto de variedades encontramos diferencias en cuanto a los resultados, pudiendo ser una de las causas el método de inoculación utilizado en el ensayo de campo. El método más utilizado en experimentación es la inoculación por micelio, ya que nos asegura el contacto entre el hongo y la herida, pero no es el método de propagación natural, que se da por conidias, utilizadas como inóculo en el experimento realizado en el laboratorio. Este ensayo en laboratorio ha mostrado más diferencias entre variedades, pudiendo concluir que ha sido más útil para la clasificación de las variedades según la incidencia del hongo en condiciones naturales.

Conclusiones

- El método de inoculación con el que más diferencias entre variedades hemos observado ha sido la inoculación en laboratorio mediante conidias.
- En el ensayo de laboratorio, las variedades mallorquinas 'Pons', 'Jordi' y 'Vivot', junto con las variedades 'Tarraco' y 'Glorieta', han mostrado más tolerancia a *P. amygdali*, mientras que las variedades 'Penta' y 'Belona' han sido las más sensibles.
- En el ensayo de laboratorio, se pue-

de hacer una clasificación de tolerancia/susceptibilidad según el porcentaje de incidencia, obteniendo:

- Variedades muy tolerantes (<20%): 'Pons', 'Jordi', 'Tarraco', 'Glorieta' y 'Vivot'.
 - Variedades tolerantes (20-40%): 'Constantí', 'Marinada', 'Soleta', 'Marta' y 'Antoñeta'.
 - Variedades susceptibles (40-60%): 'Ferragnes', 'Mardía', 'Vairo', 'Lauranne' y 'Masbovera'.
 - Variedades muy susceptibles (>60%): 'Belona' y 'Penta'.
- En las inoculaciones en campo se han encontrado menos diferencias significativas entre las variedades ensayadas, no obstante, coincidiendo con los resultados de laboratorio, la variedad 'Penta' es la que se ha mostrado más susceptible también en condiciones de campo.
 - Se pueden establecer con los datos de campo, de manera aproximada, tres grupos varietales:
 - Variedades de mayor tolerancia: 'Tarraco', 'Ferragnes', 'Marinada', 'Marta' y 'Soleta'.
 - Variedades intermedias: 'Masbovera', 'Glorieta', 'Belona', 'Constantí' y 'Antoñeta'.
 - Variedades de mayor susceptibilidad: 'Lauranne', 'Mardía', 'Vairo' y 'Penta'.

Bibliografía



- Chi, P., Jiang, Z. y Xiang, M. 2007. Flora *Fungorum Sinicorum* 34: *Phomopsis*. Science, Beijing.
- Dai, F.M., Zeng, R. y Lu, J.P. 2012. First Report of Twig Canker on Peach Caused by *Phomopsis amygdali* in China. Plant disease. Volume 96, number 2. 288 pp.
- Diogo, E.L.F., Santos J.M. y Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. Fungal Divers 44:107–115
- Mostert, L., Crous P.W., Wang J.C. y Phillips A.J.L. 2001. Species of *Phomopsis* and *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. Mycologia 93:146–167.
- Rhouma, A., Triki, M.A., Ouerteni, K. y Mezghanni, M. 2008. Chemical and biological control of *Phomopsis amygdali* the causal agent of constriction canker of almond in Tunisia. Tunis J Plant Protect 3:69–77
- Tuset, J.J. y Portilla, M.T., 1989: Taxonomic status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdolina*, *Can. J. Bot.*, 67: pp. 1.275-1.280.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H.A. y Hyde, K.D. 2011. The genus *Phomopsis*, Applications, species concepts and names of common phytopathogens.
- Vargas, F., J. y Miarnau, X. 2011. Field susceptibility to *Fusicoccum* canker of almond cultivars. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds, Octubre, 2009, Sanliurfa (Turquía). *Acta Horticulturae*, 912: 751-755.

POR LA COMPRA SUPERIOR A 80€ TE REGALAMOS UN USB DE DISEÑO EXCLUSIVO

Durante este año 2018, por la compra superior a 80€
te regalamos un USB de diseño exclusivo del
30 Aniversario de PHYTOMA-España de 4GB.

Incluye cualquier modalidad de suscripción a PHYTOMA,
la compra de revistas sueltas y/o compra de libros disponibles en nuestra web



Suscripción a papel desde 85€ (68€ estudiantes)

Suscripción digital 55€ (44€ estudiantes)

Suscripción combinada papel + digital 99€

CONSULTA EL CATÁLOGO EN NUESTRA WEB • www.phytoma.com/tienda/libros

TREINTA AÑOS REDONDOS
trabajando por la sanidad vegetal

