



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TESIS DOCTORAL

Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid

Valencia, 2008

Presentada por:

Sandra Alaniz Ferro

Dirigida por:

Dr. Josep Armengol Fortí

Dra. Paloma Abad Campos

Esta Tesis ha sido realizada en el grupo de Investigación de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia, España, gracias a la concesión de una Beca de Doctorado otorgada por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI – Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación) y una Beca de Especialización del Instituto Agroforestal Mediterráneo; y ha sido financiada por los Proyectos de Investigación AGL2003-02450 (Ministerio de Ciencia y Tecnología), AGL2006-11884-C04-01 y RTA2007-00023-C04-03 (Ministerio de Educación y Ciencia).

AGRADECIMIENTOS

Después de casi cuatro años de intenso trabajo, ha llegado el momento de dar fin a esta Tesis Doctoral. Durante este tiempo fueron muchas las personas que de una u otra manera han colaborado en su realización y, por ello, quiero agradecer sinceramente a cada una de ellas.

En primer lugar quiero agradecer a José García-Jiménez, Josep Armengol y Paloma Abad por darme la oportunidad, a pesar de no conocerme, de realizar esta Tesis, creo que no los he defraudado.

A Josep quiero agradecerle de manera especial todo el tiempo que ha dedicado a esta Tesis y a mi por supuesto; todo lo que he aprendido con sus enseñanzas, sin duda serán referente en mi futuro camino de la investigación. También quiero agradecer a Paloma y a José “Pepe” por sus comentarios y tiempo dedicado, pues han sido claves para mejorar el contenido de esta Tesis.

Todos los compañeros que están o han estado en el laboratorio han sido un gran apoyo, gracias no solo por sus aportes sino también por todos los momentos que hemos compartido haciendo más ameno todo este tiempo. Espero al nombrarlos, no olvidarme de ninguno: Alberto, Ana G., Ana P., Carlos A., Carlos Z., David, Eli, Luis A., Luis F., Lupita, Maela, Mónica, Nelson, Quini, Roberto, Toni, Valentín. A Maela quiero darle un gracias especial, además de haber compartido muchos momentos, ha sido mi guía en el aprendizaje del mundo molecular. A José Manuel y Maricarmen gracias por su colaboración. También a Luce, Alfonso, Quique y Quique A. por la gran cantidad de horas que han trabajado para sacar adelante varios de los experimentos.

A Cecilia Rego gracias por los aislados de Portugal que tan amablemente nos cedió. A Iñigo Zabalgoeazcoa por permitirnos efectuar una estancia en su laboratorio de Salamanca. A los compañeros de Virología por los materiales e instrumentos que nos proporcionaron. También a Biología Vegetal, y al vivero Herfesa S.L. por permitirnos utilizar sus instalaciones para efectuar algunos de los experimentos.

Un agradecimiento enorme a mis compañeros de Fitopatología de Uruguay, en especial a Pedro quien me ha impulsado a enfrentar este gran desafío.

Por supuesto gracias a mi familia y a mis amigos quienes, si entender demasiado en que consistía, me apoyaron incondicionalmente en este nuevo reto.

Sin duda es a Daniel, mi pareja, a quien debo dar el gracias más grande y a quien quiero dedicar esta Tesis, ha sido mi pilar a lo largo de todo este tiempo, sin él habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí, gracias de corazón.

Finalmente, también quiero dedicar esta Tesis a alguien muy especial para mí, estés donde estés estoy segura que estarás muy orgullosa de este nuevo logro en mi vida...

RESUMEN

El pie negro de la vid está causado por las especies fúngicas *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*. Estos patógenos afectan a las plantas de vid en los viveros y en las plantaciones jóvenes, principalmente de menos de cinco años de edad.

En esta Tesis se ha caracterizado una colección de 82 aislados de *Cylindrocarpon* españoles, obtenidos de plantas de vid con síntomas de pie negro procedentes de viveros y de viñedos jóvenes. Los aislados fueron identificados mediante el estudio de las secuencias de las regiones BT1 del gen de la β -tubulina e ITS del ADN ribosómico; y el análisis estadístico multivariante de las variables fenotípicas: morfología de las colonias, producción de conidios y crecimiento micelial a diferentes temperaturas. Así, 26 de los aislados correspondieron a la especie *C. liriodendri* y 56 a *C. macrodidymum*.

Barbados enraizados del portainjerto cultivar R 110 se inocularon con aislados representativos de *C. liriodendri* o *C. macrodidymum*. Todas las plantas inoculadas desarrollaron los síntomas típicos del pie negro confirmando la patogenicidad de ambas especies a vid.

La técnica de análisis “Inter-Simple Sequence Repeat” se utilizó para estudiar la diversidad genética en *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Los resultados mostraron diversidad genética en ambos patógenos siendo ésta mucho mayor en la especie *C. macrodidymum*. A su vez, los ensayos de patogenicidad efectuados con aislados seleccionados de ambas especies en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo, demostraron que *C. macrodidymum* presenta también variabilidad en virulencia.

Todos los aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* fueron caracterizados para determinar la posible presencia de micovirus. Sin embargo, con el método de extracción utilizado, que se basa en cromatografía en celulosa, no se detectó ARN de doble cadena en ninguno de ellos.

Respecto al control, los ensayos efectuados *in vitro* demostraron que tanto los tratamientos con fungicidas como con agua caliente tienen un gran potencial para controlar de manera eficaz a estos dos hongos. Los fungicidas captan, didicildimetil cloruro amónico, cubiet, oxiclورو de cobre y tiram inhibieron la germinación de los conidios de ambas especies a niveles muy satisfactorios; mientras que carbendazima, procloraz, imazalil y quinosol mostraron un buen

efecto en la reducción del crecimiento miceliar. En cuanto a los tratamientos con agua caliente, la exposición de aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* a tratamientos de 46 °C fueron suficientes para inhibir completamente la germinación de conidios; mientras que para detener el desarrollo miceliar se requirieron tratamientos de, al menos, 48 °C durante 60 minutos.

RESUM

El peu negre de la vinya està causat per les espècies de fongs *Cylindrocarpon lirioidendri* i *C. macrodidymum*. Aquests patògens afecten les plantes de vinya en els vivers i en les plantacions joves, principalment de menys de cinc anys d'edat.

En aquesta Tesi s'ha caracteritzat una col·lecció de 82 aïllats de *Cylindrocarpon* espanyols, obtinguts de plantes de vinya amb símptomes de peu negre procedents de vivers i de vinyes joves. Els aïllats van ser identificats per mitjà de l'estudi de les seqüències de les regions BT1 del gen de la β -tubulina i ITS del ADN ribosòmic; i l'anàlisi estadística multivariant de les variables fenotípiques: morfologia de les colònies, producció de conidis i creixement miceliar a diferents temperatures. Així, 26 dels aïllats van correspondre a l'espècie *C. lirioidendri* i 56 a *C. macrodidymum*.

Estaques amb arrels del portaempelt cultivar R 110 es van inocular amb aïllats representatius de *C. lirioidendri* o *C. macrodidymum*. Totes les plantes inoculades van desenvolupar els símptomes típics del peu negre confirmant la patogenicitat d'ambdós espècies a vinya.

La tècnica d'anàlisi "Inter-Simple Sequence Repeat" es va utilitzar per a estudiar la diversitat genètica en *C. lirioidendri* i *C. macrodidymum*. Els resultats van mostrar la diversitat genètica en ambdós patògens sent aquesta molt major en l'espècie *C. macrodidymum*. A més, els assajos de patogenicitat efectuats amb aïllats seleccionats d'ambdós espècies en plàntules de llavors obtingudes del cultivar Tempranillo, van demostrar que *C. macrodidymum* presenta també variabilitat en virulència.

Tots els aïllats de *C. lirioidendri* i *C. macrodidymum* van ser caracteritzats per a determinar la possible presència de micovirus. No obstant, amb el mètode d'extracció utilitzat, que es basa en cromatografia en cel·lulosa, no es va detectar ARN de doble cadena en cap d'ells.

Respecte al control, els assajos efectuats *in Vitro* van demostrar que tant els tractaments amb fungicides com amb aigua calenta tenen un gran potencial per a controlar de manera eficaç a aquests dos fongs. Els fungicides captan, didecildimetil clorur amònic, cubiet, oxiclurur de coure i tiram van inhibir la germinació dels conidis d'ambdós espècies a nivells molt satisfactoris; mentre que carbendazima, procloraz, imazalil i quinosol van mostrar un bon efecte en la

reducció del creixement miceliar. Quant als tractaments amb aigua calenta, l'exposició d'aïllats de *C. liriodendri* i *C. macrodidymum* a tractaments de 46 °C van ser suficients per a inhibir completament la germinació de conidis; mentres que per a detindre el desenvolupament miceliar es van requerir tractaments de, almenys, 48 °C durant 60 minuts.

ABSTRACT

Black foot disease of grapevine is caused by the fungal species *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. These pathogens affect grapevines in nurseries and young vineyards, mainly in one to five year old plants.

In this Thesis a collection of 82 Spanish isolates of *Cylindrocarpon*, obtained from grapevines showing symptoms of black foot disease in nurseries and young vineyards, have been characterized. All isolates were identified by sequence analyses of β -tubulin gene, region BT1, and ITS ribosomal DNA; and the multivariate factorial analysis of the phenotypical variables: colony morphology, production of conidia and the colony daily growth rate at the different temperatures studied. Thus, 26 isolates corresponded to the species *C. liriodendri* and 56 to *C. macrodidymum*.

Rooted cuttings of grapevine rootstock cv. 110 R were inoculated with representative isolates of *C. liriodendri* and *C. macrodidymum*. All inoculated plants developed the typical symptoms of black foot disease, confirming the pathogenicity of both species to grapevine.

The Inter-Simple Sequence Repeat technique was used to study the genetic diversity of *C. liriodendri* and *C. macrodidymum*. The results showed genetic diversity in both pathogens, which was higher in *C. macrodidymum*. Moreover, the pathogenicity tests performed with isolates selected from both species in grapevine seedlings obtained from cv. Tempranillo, detected virulence diversity in *C. macrodidymum*.

All isolates of *C. liriodendri* and *C. macrodidymum* were characterized to determine the possible presence of micovirus using a method based in cellulose chromatography. No double stranded RNAs were detected in any of them.

Regarding to control, *in vitro* experiments indicated that both, fungicides and hot-water treatment, have a strong potential to control these *Cylindrocarpon* species. The fungicides captan, didecyl dimethyl ammonium chloride, cubiet, copper oxiclорure and thiram, effectively reduced conidial germination in both species; while carbendazim, prochloraz, imazalil and chinisol showed a good effect reducing the growth of the mycelia. Results of hot-water treatments showed that treatments at 46 °C were enough to inhibit completely the germination of conidia of *C. liriodendri* and *C. macrodidymum*, while to avoid

the growth of the mycelia treatments of at least 48 °C, applied during 60 minutes were necessary.

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI

ÍNDICE GENERAL	Pg.
-----------------------	-----

CAPITULO 1- INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1- EL CULTIVO DE LA VID	3
1.1.1- Origen y usos	3
1.1.2- Características botánicas y condiciones del cultivo	4
1.1.3- Importancia de la vid en España y en el Mundo	5
1.2- ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA DE LA VID	8
1.2.1- Situación actual	8
1.2.2- Yesca	9
1.2.3- Enfermedad de Petri	11
1.2.4- Eutipiosis	13
1.2.5- Brazo muerto	14
1.3- EL PIE NEGRO DE LA VID	16
1.3.1- Sintomatología	17
1.3.2- Etiología y distribución mundial	18
1.3.3- Taxonomía	20
1.3.4- Biología y epidemiología	21
1.3.5- Medidas de control	23
1.4- SITUACIÓN ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA DE LA VID EN ESPAÑA	28
CAPITULO 2- OBJETIVOS	31
CAPITULO 3- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR y PATOGENICA DE <i>Cylindrocarpon</i> spp.	35
3.1- Antecedentes	37
3.2- Materiales y métodos	37
3.2.1- Aislados fúngicos	37
3.2.2- Análisis fenotípico	38
3.2.3- Análisis molecular	45

3.2.4- Patogenicidad	47
3.3- Resultados	50
3.3.1- Análisis fenotípico	50
3.3.2- Análisis molecular	57
3.3.3- Patogenicidad	63
3.4- Discusión	67

**CAPITULO 4- VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE VIRULENCIA
EN *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum***

4.1- Antecedentes	75
4.2- Materiales y métodos	76
4.2.1- Aislados fúngicos	76
4.2.2- Estudio molecular con la técnica ISSR	76
4.2.3- Patogenicidad	78
4.3- Resultados	80
4.3.1- Estudio molecular con la técnica ISSR	80
4.3.2- Patogenicidad	86
4.4- Discusión	90

**CAPITULO 5- DETECCIÓN DE MICOVIRUS EN AISLADOS DE
Cylindrocarpon liriodendri y *C. macrodidymum***

5.1- Antecedentes	95
5.2- Materiales y métodos	97
5.2.1- Aislados fúngicos	97
5.2.2- Protocolo de extracción de ARNdc	97
5.3- Resultados	100
5.4- Discusión	102

**CAPITULO 6- CONTROL *IN VITRO* DE *Cylindrocarpon liriodendri*
y *C. macrodidymum***

6.1- Antecedentes	107
6.2- Materiales y métodos	108
6.2.1- Aislados fúngicos	108
6.2.2- Ensayos con fungicidas	108
6.2.3- Ensayos de tratamientos con agua caliente.....	111

6.3- Resultados	113
6.3.1- Ensayos con fungicidas	113
6.3.2- Ensayos de tratamientos con agua caliente	117
6.4- Discusión	120
CAPITULO 7- DISCUSIÓN GENERAL	125
CAPITULO 8- CONCLUSIONES	133
CAPITULO 9- BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXOS	153

ÍNDICE DE TABLAS

Pg.

Tabla 1.1. Superficie cultivada y producción total de vid en el mundo año 2004	6
Tabla 1.2. Superficie cultivada según destino y Comunidad Autónoma en España año 2004	7
Tabla 3.1. Aislados de <i>Cylindrocarpon</i> spp. de vid estudiados	39
Tabla 3.2. Pares de cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones del genoma de <i>Cylindrocarpon</i> spp. para los estudios moleculares	46
Tabla 3.3. Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de <i>C. liriodendri</i> seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas	52
Tabla 3.4. Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de <i>C. macrodidymum</i> seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas	53
Tabla 3.5. Variables analizadas en los factores 1 y 2 extraídos del análisis factorial multivariante	54
Tabla 3.6. Valores medios y rango de las variables fenotípicas con mayor influencia en el análisis factorial multivariante utilizados para caracterizar los aislados españoles de <i>Cylindrocarpon</i>	57
Tabla 3.7. Patogenicidad de la especie <i>C. liriodendri</i> (aislados Cy 59, Cy 64 y Cy 85 analizados conjuntamente) inoculada con diferentes concentraciones de conidios en el portainjertos de vid cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación.....	63
Tabla 3.8. Patogenicidad de la especie <i>C. macrodidymum</i> (aislados Cy 1, Cy 14 y Cy 63 analizados conjuntamente) inoculada con diferentes concentraciones de conidios en portainjertos de vid del cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación.....	64
Tabla 3.9. Patogenicidad de seis aislados de <i>C. liriodendri</i> y seis de <i>C. macrodidymum</i> inoculados en el portainjerto de vid cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación	66

Tabla 4.1. Total de cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) evaluados con su temperatura de anillamiento y características de las amplificaciones obtenidas mediante PCR. Los cebadores marcados con negrita corresponden a los seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i>	81
Tabla 4.2. Cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> y sus características principales	82
Tabla 4.3. Virulencia de aislados españoles de <i>C. liriodendri</i> (CL) y <i>C. macrodidymum</i> (CM), seleccionados de los siete grupos ISSR definidos de acuerdo al análisis ISSR, a plántulas de vid obtenidas de semillas del cultivar Tempranillo dos meses después de la inoculación.....	87
Tabla 6.1: Principales características de las materias activas fungicidas utilizadas en los ensayos de germinación de conidios y crecimiento miceliar de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i>	109
Tabla 6.2. Valores de la Concentración Efectiva 50 (mg L ⁻¹ o ppm) de los 14 fungicidas evaluados en la inhibición de la germinación de conidios y crecimiento miceliar en los aislados Cy 59 y Cy 88 de <i>C. liriodendri</i> y Cy 14 y Cy 63 de <i>C. macrodidymum</i>	115
Tabla 6.3. Ecuaciones de regresión lineal múltiple obtenidas entre los valores de germinación de conidios y crecimiento miceliar transformados como arcoseno de $(Y/100)^{1/2}$, y las variables temperatura y tiempo para cada aislado de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> estudiado	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Pg.

Figura 1.1. Corte transversal (a) y longitudinal (b) de una planta joven de vid afectada por <i>Cylindrocarpon</i> ; obsérvese la necrosis generalizada de la madera del portainjerto	18
Figura 3.1. Aspecto del anverso de algunas de las colonias de <i>Cylindrocarpon</i> spp. crecidas en medio PDA	50
Figura 3.2. Aspecto de algunas de las estructuras de <i>Cylindrocarpon</i> spp. en colonias crecidas en medio PDA y en medio SNA	51
Figura 3.3. Aspecto de algunas de las estructuras de <i>Neonectria liriodendri</i> después de dos meses de cultivo en medio AA con adición de acículas de pino	53
Figura 3.4. Proyección de las variables analizadas según los dos factores seleccionados en el análisis estadístico multivariante	55
Figura 3.5. Proyección de los aislados de <i>Cylindrocarpon</i> spp. estudiados sobre el plano de los dos factores seleccionados en el análisis estadístico factorial multivariante	56
Figura 3.6. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores Dest1/Dest4.....	58
Figura 3.7. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores BT1a/BT1b	59
Figura 3.8. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la β -tubulina (BT1), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura	60
Figura 3.9. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores universales ITS1/ITS2	61
Figura 3.10. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura	62
Figura 3.11. Aspecto de las raíces de los barbados del cultivar 110 R inoculados con suspensiones de conidios de diferentes concentraciones del aislado Cy 59 de <i>C. liriodendri</i>	67

Figura 4.1. Patrones de bandas de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> obtenidos con los cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): A) cebador (TCG) ₅ , y B) cebador (CCA) ₅	83
Figura 4.2. Patrones de bandas de <i>C. liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> obtenidos con los cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): A) cebador (CGA) ₅ y B) cebador (GT) ₇	84
Figura 4.3. Dendrograma obtenido con los 82 aislados españoles de <i>Cylindrocarpon</i> de vid y los aislados de referencia de <i>C. liriodendri</i> de Portugal (CBS 117640, CBS 117526, Cy 15 Portugal, Cy 13 Portugal) y <i>C. macrodidymum</i> de Australia (CBS 112609)	85
Figura 4.4. Síntomas desarrollados en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo dos meses después de inoculadas con <i>C. macrodidymum</i> ; a) y b) plantas inoculadas con el aislado Cy 22 (grupo ISSR, G4); c) y b) plantas inoculadas con el aislado Cy 101 (grupo ISSR, G6)	89
Figura 5.1. Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc	101
Figura 5.2. Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc antes y después de la digestión con la enzima DNAsa	102
Figura 6.1. Aspecto de los conidios del aislado Cy 88 de <i>C. liriodendri</i> después de 24 horas mantenidos en solución con el fungicida captan ...	116
Figura 6.2. Aspecto de las colonias del aislado Cy 14 de <i>C. macrodidymum</i> después de diez días de crecimiento en medio PDA con el fungicida carbendazima	116
Figura 6.3. Porcentaje de germinación de conidios respecto al control de <i>C. liriodendri</i> (aislados Cy 59 y Cy 88) y <i>C. macrodidymum</i> (aislados Cy 14 y Cy 63) tras el tratamiento con agua caliente a las temperaturas de 41, 42, 43, 44, 45 y 46 °C durante 30, 45 o 60 minutos	117
Figura 6.4. Porcentaje de crecimiento miceliar respecto al control de <i>C. liriodendri</i> (aislados Cy 59 y Cy 88) y <i>C. macrodidymum</i> (aislados Cy 14 y Cy 63) tras el tratamiento con agua caliente a las temperaturas de 43, 44, 45, 46, 47 y 48 °C durante 30, 45 o 60 minutos	118

CAPÍTULO 1



INTRODUCCIÓN GENERAL

1- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1- EL CULTIVO DE LA VID

1.1.1- Origen y usos

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más antiguos del mundo ya que sus orígenes se remontan prácticamente a la aparición misma del hombre. En los comienzos, éste se alimentaba de los frutos de las plantas que crecían de forma silvestre en su entorno y, posteriormente, al igual que muchas de las plantas que les resultaban útiles la domesticó para utilizarla para su consumo.

El origen geográfico de la vid se sitúa entre Europa y Asia Central, en la región del Cáucaso, entre el Mar Negro y el Mar Caspio. Los primeros indicios de la actividad vitícola aparecen en esta zona, y datan de 5000 años antes de Cristo. A partir de aquí, el cultivo de la vid fue extendiéndose hacia occidente pasando por Mesopotamia, Siria, Fenicia, Egipto y Grecia y de ahí al resto de Europa y del mundo. Los colonos españoles fueron los que lo introdujeron en América del Norte desde donde se extendió a todo el continente americano (Hidalgo, 2002).

La uva, fruto de la vid, se ha utilizado para consumo en fresco o conservado bajo forma de pasas; pero también para la producción del vino, una de las bebidas más populares y milenarias que se conoce. Estas tres formas de consumo son tan tradicionales y antiguas como el cultivo mismo (Hidalgo, 2002). El vino era conocido en todos los pueblos antiguos, desde la India pasando por Grecia, Egipto y en el Imperio Romano. Desde el siglo V hasta el Renacimiento, la viticultura fue mantenida y mejorada en Europa por las órdenes religiosas y la nobleza. Posteriormente, la colonización española expandió la producción y consumo del vino por el Nuevo Mundo (Surico, 2000).

1.1.2- Características botánicas y condiciones del cultivo

La vid es un arbusto sarmentoso y trepador, que se apoya y fija a tutores naturales o artificiales mediante zarcillos. Si no encuentra tutor, se extiende naturalmente por el terreno de forma más o menos erguida pudiendo ocupar extensiones considerables. En las zonas opuestas a las hojas se ubican los zarcillos o las inflorescencias. Este arbusto es muy longevo pudiendo superar en algunos casos los 100 años de vida.

La vid pertenece a la familia *Vitaceae* que incluye entre otros a los géneros *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus*, *Tetrastigma* y *Vitis*. El género *Vitis*, al que corresponden las vides cultivadas, según la clasificación clásica se divide en dos secciones o subgéneros: *Euvitis* y *Muscardinia* (Hidalgo, 2002; Salazar, 2002).

El subgénero *Muscardinea* contiene tres especies de las cuales solamente una es cultivada, *V. rotundifolia*. Esta especie, originaria del sur de Estados Unidos, muestra resistencia a varias enfermedades y al insecto responsable de la filoxera, *Dactylophaera vitifoliae*, por lo que presenta gran interés en la mejora del cultivo de la vid.

El otro subgénero, *Euvitis*, comprende unas 30 especies que se distribuyen mundialmente de la siguiente manera:

Americanas: agrupa a una veintena de especies que presentan pocas aptitudes viníferas con la excepción de *V. labrusca*. Del resto, existen varias que por su resistencia a la filoxera se han utilizado como portainjertos o para la producción de plantas madres e híbridos productores directos. Entre los más importantes se citan *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* y *V. cordifolia*.

Asiáticas: existen unas veinte especies que no presentan apenas interés para la producción de uva. Entre ellas se encuentra *V. amurensis*.

Europeas: sólo hay una especie, *V. vinifera*. Ésta es la que presenta las mejores cualidades para la producción de uva de mesa, pasas y vino. Incluye varios miles

de variedades o cultivares como resultado de cruzamientos naturales. La selección natural ha eliminado los individuos peor adaptados al medio y, posteriormente, el hombre ha seleccionado las variedades que más se adaptan a sus necesidades de producción. Esta especie presenta el gran inconveniente de ser altamente sensible a la filoxera y a varias enfermedades.

El cultivo de la vid se adapta muy bien a diferentes condiciones climáticas y tipos de suelo. Si bien es exigente en calor y sensible a las heladas, durante el invierno cuando la planta está en receso, puede soportar temperaturas de hasta -15 °C; aunque una vez ocurrida la brotación, una exposición a tan sólo -2 °C puede ocasionar la pérdida total de la cosecha. En el otro extremo puede sobrellevar temperaturas de hasta 40 °C y, en ocasiones, de hasta 45 °C.

En cuanto a sus requerimientos de suelo, se adapta muy bien a diferentes tipos; no obstante, la calidad del vino puede variar según el tipo de suelo dónde se cultiva, por lo que éste resulta un factor determinante en la producción. Asimismo, la vid es muy resistente a la sequía; una vez cubiertas las necesidades mínimas de agua, con unas pocas lluvias puede vegetar sin problemas (Hidalgo, 2002).

1.1.3- Importancia de la vid en España y en el Mundo

La superficie mundial de vid se encuentra en torno a los 7,4 millones de hectáreas con una producción total de 66.679.229 t. España se sitúa en el primer lugar en cuanto a superficie cultivada con 1.176.133 ha, y el tercero en cantidad de toneladas producidas (Tabla 1.1) (FAO, 2008). El cultivo de la vid en España se desarrolla mayoritariamente en secano, lo que determina un menor rendimiento en kg ha⁻¹ comparado con otros países. No obstante, este rendimiento ha ido aumentando, aunque lentamente, a lo largo de los últimos años (MAPA, 2007).

En España, la vid se cultiva en todas las Comunidades Autónomas (Tabla 1.2) ocupando el segundo lugar en superficie total cultivada después del olivo (MAPA, 2007). En Castilla-La Mancha hay plantadas 566.587 ha,

aproximadamente la mitad del total existente en España. Esta superficie coloca a Castilla-La Mancha en el cuarto puesto en el mundo en cuanto a área cultivada. Le siguen en superficie Extremadura, Comunidad Valenciana, Castilla y León y Cataluña que en total suman un 27 %, mientras que el resto se distribuye en las demás Comunidades Autónomas.

Tabla 1.1. Superficie cultivada y producción total de vid en el mundo año 2004.

País	Superficie cultivada (miles de ha)	País	Producción total (miles de t)
España	1.176	Italia	8.692
Francia	852	Francia	7.563
Italia	840	España	7.286
Turquía	530	Estados Unidos	5.661
China	438	China	5.533
Estados Unidos	377	Turquía	3.500
Irán	275	Irán	2.800
Portugal	210	Argentina	2.365
Argentina	208	Australia	2.150
Rumania	203	Chile	1.900
Chile	175	Sudáfrica	1.683
Australia	151	Grecia	1.300
Otros países	1.997	Otros países	16.247
Total Mundial	7.432	Total Mundial	66.679

(Fuente: FAO, 2008)

El destino principal de la producción es la vinificación; el 97 % del total de la superficie plantada está destinada a la elaboración de vino, mientras que el restante 3 % se dedica a uva de mesa, pasificación y viveros. Tanto la producción de uva de mesa como de plantas en viveros se desarrolla mayoritariamente en la Comunidad Valenciana, mientras que la pasificación en Andalucía (Tabla 1.2).

En la Comunidad Valenciana, concretamente en la provincia de Valencia, se encuentran casi la totalidad (95 %) de los viveros de vid de todo el país. Allí se produce gran parte de las plantas de vid de España, que son trasladadas luego al resto del país, cubriendo las necesidades de otras Comunidades Autónomas.

Tabla 1.2. Superficie cultivada según destino y Comunidad Autónoma en España año 2004.

Comunidad Autónoma	Uva de mesa (ha)	Uva para vinificación (ha)	Uva para pasificación (ha)	Viveros (ha)
Andalucía	3.428	36.801	4.080	–
Aragón	145	43.107	–	–
Baleares	66	1.890	–	–
C. Valenciana	11.519	74.940	–	3.433
Canarias	131	18.831	–	24
Cantabria	–	42	–	–
Castilla y León	200	66.709	–	–
Castilla-La Mancha	208	566.587	–	25
Cataluña	39	65.414	–	116
Extremadura	650	89.108	40	–
Galicia	–	33.090	–	–
La Rioja	–	43.662	–	–
Madrid	23	18.526	–	–
Navarra	–	24.863	–	–
P. de Asturias	–	120	–	–
País Vasco	–	13.154	–	–
R. de Murcia	6.302	45.524	–	–
Total	22.711	1.142.368	4.120	3.598

(Fuente: MAPA, 2007)

1.2- ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA DE LA VID

1.2.1- Situación actual

Bajo el término “*enfermedades fúngicas de la madera de la vid*” se incluyen a todas aquellas enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera de la vid provocando su deterioro y, posteriormente, en un plazo de tiempo indeterminado, la muerte de parte de la planta o de la planta entera.

Tradicionalmente, las llamadas enfermedades fúngicas de la madera de la vid se han asociado principalmente a dos patologías: yesca y eutipiosis. Ambas enfermedades afectan mayoritariamente a plantas adultas de más de diez años de edad, causando alteraciones internas de la madera que provocan decaimiento general, reducción de calidad y cantidad de la cosecha y, finalmente, la muerte de parte o la planta entera de manera más o menos rápida.

A partir de la década de 1990, coincidiendo con el establecimiento de numerosas plantaciones nuevas, se comenzó a detectar en diferentes regiones del mundo, incluida España, un aumento en el decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes ya desde el primer año de la plantación. Este fenómeno también se ha observado durante el proceso de producción de plantas en los viveros. En la madera de las plantas afectadas se han aislado diferentes especies de hongos que no se corresponden con los asociados tradicionalmente a las enfermedades de la madera de la vid. Esta situación ha provocado un renovado interés en el estudio de estas enfermedades, impulsando el desarrollo de nuevas líneas de investigación en todo el mundo (Mugnai *et al.*, 1999; García-Jiménez, 2004).

Este incremento en la incidencia de enfermedades fúngicas de la madera en plantas jóvenes puede relacionarse, según algunos investigadores, con varios factores. En primer lugar, con una reducción en el cuidado sanitario del material de propagación, con lo cual se ha visto disminuida la calidad de las plantas de vivero. En segundo lugar, con los cambios ocurridos en las prácticas culturales y manejo del viñedo, siendo quizás uno de las más relevantes la escasa protección de las heridas de poda en el campo que pueden favorecer la entrada de diferentes

patógenos. Y, finalmente, la prohibición del uso del arsenito de sodio que ha sido reemplazado por otros fungicidas menos eficaces (Chiarappa, 2000; Graniti *et al.*, 2000).

Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid pueden estar causadas por un elevado número de especies que pueden afectar a plantas de diferentes edades. Estos hongos se agrupan en una serie de patologías que pueden ocurrir independientemente, en forma simultánea, o incluso ser precursoras unas de otras en la misma planta (Mugnai *et al.*, 1999). A continuación se detallan cada una de ellas por separado, con excepción del pie negro de la vid causado por *Cylindrocarpon* spp., a la que se le dedicará un apartado diferente por ser el tema de estudio de la presente Tesis.

1.2.2- Yesca

La yesca es una de las más antiguas y, posiblemente, la más compleja de las enfermedades descritas en la vid. En las épocas griega y romana era conocida por el típico marchitamiento que causa en las plantas afectadas como consecuencia de la degradación de la madera (Surico, 2000). Los síntomas externos se observan en plantas adultas y se pueden manifestar bajo dos formas: lenta o crónica, que se caracteriza por un deterioro gradual del follaje, y otra rápida o apopléjica, que consiste en una muerte súbita de la planta (Mugnai *et al.*, 1999; Pearson y Goheen, 2001).

En la forma lenta o crónica, los síntomas en el follaje aparecen después de la floración, durante el verano o inicios de otoño, comenzando por las hojas basales de las ramas y extendiéndose luego al resto. En las zonas internerviales de las hojas aparecen coloraciones amarillentas en las variedades blancas y rojizas en las tintas, que evolucionan posteriormente a necrosis deteriorándolas gravemente y causando una caída prematura de las hojas. Estos síntomas pueden variar de un año a otro en la misma planta manifestándose de forma crónica o errática.

A su vez, la forma rápida o apopléjica resulta más espectacular, pues consiste en una muerte súbita de la planta en períodos de alta temperatura durante el verano; en algunas ocasiones incluso sin que se haya manifestado previamente ningún tipo de síntoma. El follaje y los frutos comienzan a deshidratarse de forma brusca desde las extremidades, hasta culminar con la muerte de la planta en unos pocos días (Beltrán *et al.*, 2004).

En ocasiones, en los frutos aparecen además unos síntomas denominados “black measles” que consisten en unos puntos de color violeta casi negro distribuidos por toda la epidermis de las bayas. Los frutos afectados pueden mantenerse turgentes hasta la maduración, o desecarse y colapsar. Estos síntomas en los frutos pueden aparecer sin que se manifiesten los síntomas foliares (Mugnai *et al.*, 1999; Pearson y Goheen, 2001).

En el interior de la madera de las plantas afectadas con cualquiera de los síntomas anteriormente descritos, se observa una podredumbre seca y esponjosa de color claro amarillento, típica de esta enfermedad. Esta podredumbre puede ocurrir tanto en el tronco principal como en los brazos, pero generalmente se encuentra asociada a heridas de poda u otras heridas. En cortes transversales, la podredumbre esponjosa habitualmente está rodeada por una fina línea marrón oscura. En el resto de la madera pueden observarse otros tipos de deterioro: i) pequeñas punteaduras marrón oscuras o negras que se muestran como estrías necróticas en cortes longitudinales y que se ubican siguiendo los anillos de crecimiento; ii) áreas de color marrón-rosa o marrón-rojizo, a menudo desarrolladas desde las punteaduras y ubicadas principalmente en el centro del tronco o en el margen de las áreas necróticas, separando a éstas de la zona aparentemente sana; y iii) áreas amarronadas que varían en forma y textura, que se mezclan con los anteriores síntomas descritos, a menudo ubicados en sectores que conectan con heridas importantes.

Los hongos tradicionalmente asociados a la yesca son los basidiomicetos *Fomitiporia mediterranea* Fischer y, con menor frecuencia, *Stereum hirsutum* (Willd.:Fr.) S.F. Gray. Ambos se aíslan principalmente de la podredumbre esponjosa de color claro, aunque en ensayos de patogenicidad no se ha logrado reproducir claramente este síntoma (Larignon y Dubos 1997; Mugnai *et al.*,

1999; Graniti *et al.*, 2000). *F. mediterranea* originalmente era conocido como *Phellinus igniarius* (L.:Fr.) en Italia, y como *P. punctatus* (P. Karst.) Pilát. en Francia; posteriormente fue renombrado como *F. punctata* (Fr.) Murrill (Mugnai *et al.*, 1999) y en la actualidad como *F. mediterranea* (Fischer, 2002).

Sin embargo, éstos no son los únicos hongos que se han aislado de las lesiones antes descritas; también *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf & Mugnai) Crous & W. Gams se aíslan frecuentemente. Estas especies se han encontrado asociadas principalmente a la línea oscura y punteaduras o estrías necróticas (Larignon y Dubos 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2000; Dubos, 2002; Graniti, 2006).

Larignon y Dubos (1997) desarrollaron una hipótesis en la que proponen que la yesca es consecuencia de una sucesión de hongos. *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. serían los pioneros en infectar la planta, favoreciendo luego la infección y colonización de *F. mediterranea* y *S. hirsutum*.

1.2.3- Enfermedad de Petri

La enfermedad de Petri está estrechamente relacionada con el decaimiento de plantas jóvenes de vid ocurrido en las últimas dos décadas. A esta enfermedad se le han dado también otros nombres como “black goo”, “grapevine decline” o “young yesca” (Morton, 2000; Rego *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2001). Finalmente, se consensuó denominarla “enfermedad de Petri” en honor al investigador italiano Lionello Petri que en 1912 describió por primera vez los síntomas típicos de esta enfermedad (Petri, 1912).

Al contrario que la yesca, esta patología ocurre principalmente en plantas jóvenes de menos de cinco años de edad (Serra *et al.*, 2000; Armengol *et al.*, 2001a; Edwards *et al.*, 2001; Rumbos y Rumbou, 2001; Halleen *et al.*, 2003). Externamente, las plantas se muestran débiles, con disminución del crecimiento, entrenudos cortos, follaje pobremente desarrollado y de aspecto clorótico o necrótico. Estos síntomas pueden, finalmente, conducir a la muerte de toda la planta que, en ocasiones, incluso no llega ni a brotar.

Los síntomas que se desarrollan en el interior de la madera son los típicos descritos por L. Petri en 1912. Los vasos xilemáticos se necrosan y aparecen, en cortes transversales, punteaduras de color oscuro o negro, más o menos agrupadas, que rodean la médula en forma de anillo, mientras que en cortes longitudinales se muestran como estrías oscuras. Los vasos dañados pueden exudar con el tiempo una goma de color oscuro. Estos síntomas, si bien pueden aparecer a lo largo de toda la madera del portainjerto, del injerto, e incluso de la variedad, en general son más acentuados en la zona basal del portainjerto.

Diferentes especies del género *Phaeoacremonium* y *Pa. chlamydospora* son las responsables de causar la enfermedad de Petri. Estos hongos se han aislado consistentemente de las punteaduras o estrías negras en el interior de la madera de las plantas afectadas. Asimismo, en inoculaciones sobre material vegetal de vid con algunos de estos patógenos, se han desarrollado síntomas similares a los descritos anteriormente (Larignon y Dubos, 1997; Scheck *et al.*, 1998b; Eskalen *et al.*, 2007).

El género *Phaeoacremonium* fue creado por Crous *et al.* (1996) para agrupar las especies antes descritas como *Cephalosporium* sp. y *Phialopora parasitica* Ajello, Geog. & C.J.K. Wang. En este género se incluyeron, entre otras, las especies *Pm. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai y *Pm. chlamydosporum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai. Posteriormente la especie *Pm. chlamydosporum* fue situada en un nuevo género y renombrada como *Pa. chlamydospora* (Crous y Gams, 2000).

Dentro del género *Phaeoacremonium* se han descrito hasta la fecha 13 especies asociadas a la enfermedad de Petri, éstas son: *Pm. angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf., *Pm. australiense* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm. austroafricanum* L. Mostert, W. Gams & Crous, *Pm. inflatipes* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm. iranianum* L. Mostert, Gräf., W. Gams & Crous, *Pm. krajdennii* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm. mortoniae* Crous & W. Gams, *Pm. parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf., *Pm. scolyti* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm. subulatum* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm. venezuelense* L. Mostert, Summerb. & Crous, *Pm.*

viticola J. Dupont y la anteriormente mencionada *Pm. aleophilum*. Esta última especie es la más importante del grupo, pues se aísla con bastante más frecuencia que el resto (Dupont *et al.* 2000; Moster *et al.*, 2006).

Por otra parte, tal como se comentó anteriormente, estas especies también están incluidas dentro del complejo de hongos asociados a la enfermedad de la yesca, dónde además son aislados de síntomas similares. Actualmente, se considera que ambas enfermedades se encuentran estrechamente relacionadas, pues las plantas jóvenes afectadas por los hongos que causan la enfermedad de Petri, podrían luego infectarse con los basidiomicetos asociados a la yesca, actuando como precursores de ésta última (Mugnai *et al.*, 1999; Graniti *et al.*, 2000; Serra *et al.*, 2000).

1.2.4- Eutipiosis

La eutipiosis, si bien era conocida con anterioridad, a partir de los años 70 comienza a ser catalogada como una de las enfermedades de la madera más destructiva de la vid. A lo largo de esta década, es citada en muchas de las regiones productoras de vid en el mundo en las que estaba causando pérdidas de consideración. Actualmente, su distribución a nivel mundial está muy generalizada, siendo limitada principalmente por la incidencia de las lluvias. En general, aparece abundantemente cuando la media anual excede los 600 mm y es menos probable cuando ésta es inferior a los 250 mm (Pearson y Goheen, 2001; Dubos, 2002).

La eutipiosis, también llamada “eutypa dieback”, raramente afecta a plantas de menos de ocho años de edad. Los síntomas en la parte aérea son fácilmente reconocibles. Durante los primeros meses, al inicio del ciclo del cultivo en la primavera, se observan deformaciones y decoloraciones en las brotaciones nuevas. Los entrenudos son más cortos y las hojas son más pequeñas de lo normal, algo deformes y de aspecto clorótico. En ocasiones, las hojas desarrollan pequeñas manchas necróticas que con el tiempo coalescen formando áreas necróticas de mayor tamaño. Estos síntomas se ven hasta el final de la

primavera, volviéndose más acentuados cada año hasta que finalmente parte o todo el brazo deja de brotar.

La observación del brazo o tronco que desarrolla estos síntomas aéreos, revela la presencia de un chancro asociado generalmente a una herida de poda de cierta edad. Al realizar un corte transversal en esta zona, aparece en el interior de la madera una necrosis sectorial de color marrón oscuro, habitualmente en forma de “v” y, al contrario que la yesca, de consistencia dura.

El ascomiceto *Eutypa lata* (Pers.:Fr.) Tul. & Tul. es el hongo responsable de la eutipiosis. *E. armeniaca* Hansa. & M.V. Carter es otra especie que ha sido descrita asociada a esta enfermedad es, aunque luego se confirmó que se trataba de la misma especie (Rolshausen, *et al.* 2006). La forma asexual corresponde a *Libertella blepharis* A.L. Smith. Este hongo, además de la vid, afecta a unas 80 especies de plantas (Pearson y Goheen, 2001).

Las ascosporas de *E. lata* desempeñan un rol preponderante en el ciclo de la enfermedad, ya que son las responsables de diseminar la eutipiosis causando infecciones en otras plantas. Los peritecios se desarrollan sobre los chancros de las vides afectadas. Luego, en primavera, las ascosporas son dispersadas por las lluvias que infectan nuevas vides ingresando por las heridas, principalmente de poda de los brazos y/o tronco. Estas heridas son más susceptibles cuando son recientes, luego se vuelven más resistentes con la edad hasta que ya no pueden ser infectadas (Petzoldt *et al.* 1981). Transcurridos uno o dos años desde que ocurre la infección se observan los primeros síntomas, siendo éstos más evidentes a los tres o cuatro años. Sin embargo, deben transcurrir aún varios años más para que se produzca la muerte del brazo o la planta entera (Dubos, 2002).

1.2.5- Brazo muerto

El brazo muerto o “black dead arm” está causado por diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007). Esta enfermedad fue descrita por primera vez afectando a la vid en Hungría en el año

1974, luego su presencia fue confirmada en Italia y posteriormente en diferentes regiones del mundo (Dubos, 2002). Además de la vid, especies de esta familia afectan a muchas otras plantas leñosas causando daños muy severos hasta llegar incluso a la muerte de la planta. No obstante, durante mucho tiempo, tanto en la vid como en otros hospedantes, estos hongos fueron relegados porque se consideraban patógenos de debilidad o simples saprofitos.

Generalmente, las plantas afectadas son adultas, de más de ocho años de edad, aunque estos hongos se han aislado también de plantas más jóvenes e incluso de plantas de vivero (Rumbos y Rumbou, 2001; Halleen *et al.*, 2003; Edwards y Pascoe, 2004). Los primeros síntomas en la parte aérea se observan en primavera y se manifiestan durante todo el ciclo del cultivo. Éstos aparecen primero en las hojas basales de las ramas y luego se extienden al resto. Esta evolución puede ocurrir de forma severa o lenta pero causando siempre la caída prematura de las hojas (Larignon *et al.* 2001; Dubos, 2002).

En la forma severa se produce una defoliación rápida de las ramas acompañado por un desecamiento de las flores o frutos. En algunas de estas ramas pueden permanecer algunas hojas en la punta, pero la mayoría muere y cae al suelo. A su vez, la forma lenta se caracteriza por el desarrollo de manchas foliares de color rojo-oscuro (variedades tintas) o amarillo-naranja (variedades blancas) en la lámina o margen de las hojas. Con el tiempo colapsan formando grandes zonas deterioradas que muestran diferentes patrones de necrosis, produciéndose luego la caída de muchas de ellas (Larignon y Dubos, 2001). Paralelamente, las flores y frutos pueden marchitarse.

En la madera, mediante cortes transversales, se observan necrosis sectoriales de color oscuro y consistencia dura que comienzan en la base de las ramas afectadas y se extienden hacia abajo a la zona del injerto. Estas necrosis están generalmente asociadas a un corte de poda u otra herida. Muchas veces, este síntoma se confunde con el causado por *E. lata*. Externamente, en las zonas afectadas se forman numerosos cuerpos fructíferos de color negro, solos o agrupados, que corresponden a las estructuras reproductivas del patógeno.

El número de especies asociadas a la enfermedad del brazo muerto, ha ido incrementándose a lo largo de los años, ya sea por la descripción de nuevas especies como por la revisión taxonómica que se está efectuando. Las primeras especies asociadas al brazo muerto fueron *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. y *Di. seriata* De Not. en Italia (Larignon y Dubos, 2001). Posteriormente, además de las anteriores, en Portugal se describió *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces & De Not. (anamorfo *Fusicoccum aesculi* Corda) (Phillips, 1998), que fue después dividida en tres especies: *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *N. luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips y *B. dothidea* (Phillips, 2002).

Actualmente, además de las anteriores, en las diferentes zonas vitícolas del mundo se han descrito otras especies asociadas al brazo muerto: *N. australe* Slippers, Crous & M.J. Wingf., *N. ribis* (Grossenb. & Dugg.) Crous, Slippers & AJL Phillips, *N. viticlavatum* Niekerk & Crous, *N. vitifusiforme* Niekerk & Crous, *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, Luque & Alves, *Do. sarmentorum* A.J.L. Phillips, Alves & Luque, *Do. viticola* A.J.L. Phillips & Luque y *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl., Bull. (van Niekerk *et al.*, 2004; Martos y Luque, 2004; Luque *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005; Urbez-Torres *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2006; Martin y Cobos, 2007; Phillips, 2008).

1.3- EL PIE NEGRO DE LA VID

La enfermedad del pie negro, también llamada “black foot” en inglés o “pied noir” en francés, está causada por diferentes especies del género *Cylindrocarpon* (Halleen *et al.*, 2006a). Si bien, la primera cita que relaciona a *Cylindrocarpon* con plantas de vid data del año 1961 (Maluta y Larignon, 1991), es a partir de los años 90 cuando este género comienza a ser considerado de interés como patógeno de la vid, coincidiendo con la emergencia de los problemas de decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes vid.

Las especies de *Cylindrocarpon* se aíslan frecuentemente a partir de material vegetal de viveros y de plantas jóvenes con síntomas de decaimiento en

diferentes regiones productoras de vid en el mundo (Scheck *et al.*, 1998c; Rego *et al.*, 2000; Armengol *et al.*, 2001a; Rumbos y Rumbou, 2001; Edward y Pascoe, 2004). En Sudáfrica además, aunque en muy baja incidencia, también se han aislado en las plantas madres de los portainjertos (Fourie y Halleen, 2004a). Asimismo, en Sudáfrica y más recientemente en California, estos patógenos han sido considerados por algunos investigadores como los más importantes en los viveros (Halleen *et al.*, 2003; Dubrovsky y Fabritius, 2007).

En España, algunas investigaciones recientes han constatado la importancia de *Cylindrocarpon* en el cultivo de la vid, que se ha encontrado afectando tanto a plantas de vivero como a plantas de parcelas jóvenes (Aroca *et al.*, 2006; Giménez-Jaime *et al.*, 2006).

1.3.1- Sintomatología

Durante la primavera, las plantas de vid infectadas con *Cylindrocarpon* spp. presentan un retraso en su desarrollo, con una vegetación débil, hojas cloróticas y achaparradas por la falta de agua y entrenudos más cortos. En ocasiones, algunas yemas o la planta entera no llegan ni a brotar. Estos síntomas aéreos son consecuencia de los daños sufridos en las raíces y cuello de la planta, que es dónde ocurre la infección. Asimismo, estos síntomas son muy generales y pueden fácilmente confundirse con los producidos por la enfermedad de Petri.

Las raíces de las plantas afectadas presentan lesiones oscuras, necróticas y deprimidas con la consiguiente reducción de la barbada. En ocasiones, para compensar esta pérdida de masa radicular, algunas plantas desarrollan una nueva emisión de raíces, normalmente por encima de la zona afectada, quedando más cercana a la superficie del suelo. En la madera del portainjerto se observan coloraciones oscuras y necrosis que se inician desde la base del mismo y se extienden hacia arriba. En cortes transversales, estas lesiones necróticas pueden ir desde la corteza hasta la médula (Figura 1.1). Observaciones más detalladas indican que los vasos conductores presentan tilosis o goma de color marrón. Asimismo, observaciones bajo el microscopio revelan la presencia de hifas en las células adyacentes al floema y al xilema joven.



Figura 1.1. Corte transversal (a) y longitudinal (b) de una planta joven de vid afectada por *Cylindrocarpon*; obsérvese la necrosis generalizada de la madera del portainjerto.

Estos síntomas pueden, finalmente, conducir a la muerte de la planta en la misma campaña o en las campañas siguientes, ocurriendo más rápidamente cuanto más joven es la planta afectada (Grasso, 1984; Maluta y Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998a; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2006a).

Las coloraciones oscuras y necrosis, principalmente en la base del portainjerto, son las que han dado a la enfermedad el nombre de pie negro (Grasso y Magnano Di San Lio, 1975; Maluta y Larignon, 1991).

1.3.2- Etiología y distribución mundial

Tradicionalmente, dos especies del género *Cylindrocarpon* se han asociado al pie negro de la vid: *C. destructans* (Zinssmeister) Scholten, y *C. obtusisporium* (Cooke y Harkn.) Wollenweb. *C. destructans* fue descrita por primera vez afectando vid en Francia en el año 1961 (Maluta y Larignon, 1991) y, desde entonces, se ha identificado en Italia (Grasso, 1984), Portugal (Rego *et al.*, 2000), Argentina (Gatica *et al.*, 2001), Alemania (Fischer y Kassemeyer,

2003), Nueva Zelanda y Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2004), Brasil (Garrido *et al.*, 2004) y California (Petit y Gubler, 2005). Paralelamente, se citó la presencia de *C. obtusisporium* en Sicilia (Grasso y Magnano Di San Lio, 1975) y luego en California (Scheck *et al.*, 1998a).

Recientemente, Halleen *et al.* (2004) caracterizaron filogenéticamente una colección de aislados de *Cylindrocarpon* de vid procedentes de Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia y Francia y describieron una tercera especie, *C. macrodidymum* Halleen, Schroers y Crous, que posteriormente también fue citada en California (Petit y Gubler, 2005) y Chile (Auger *et al.*, 2007).

En un trabajo posterior, Halleen *et al.* (2006b) compararon aislados de *C. destructans* de diferentes hospedantes herbáceos y leñosos con otras especies de este género. Los resultados revelaron que todos los aislados provenientes de vid, originarios de Francia, Portugal y Sudáfrica, e identificados previamente como *C. destructans*, presentaban secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosómico y del gen de la β -tubulina, idénticas a la especie *C. liriodendri* J.D. MacDonald y E.E. Butler, que había sido descrita anteriormente como causante de podredumbre de raíces en *Liriodendron tulipifera* L. (MacDonald y Butler, 1981). Como consecuencia, Halleen *et al.* (2006b) propusieron que todos los aislados de *C. destructans* procedentes de vid incluidos en este estudio, debían ser renombrados como *C. liriodendri*; manteniéndose el nombre de *C. destructans* para el resto de los aislados originarios de otros hospedantes. Petit y Gubler (2007), realizaron un estudio similar llegando a la misma conclusión con los aislados de *C. destructans* obtenidos de vid en California. Posteriormente, esta especie también fue citada en Australia (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007).

Dentro de este género, en Eslovenia y Nueva Zelanda, se acaba de describir una nueva especie asociada a la vid, *C. pauciseptatum* Schroers & Crous. Sin embargo, aunque esta especie se ha aislado de las raíces de plantas de vid, su patogenicidad en este cultivo aún no ha sido verificada (Schroers *et al.*, 2008).

En otros países productores de vid como España o Grecia, se ha aislado *Cylindrocarpon* spp. de plantas jóvenes de vid con síntomas de decaimiento pero, hasta la fecha, no se han identificado a nivel de especie (Armengol *et al.*, 2001a; Rumbos y Rumbou, 2001).

Además de *Cylindrocarpon*, existe otro género asociado al pie negro de la vid, *Campylocarpon*. Halleen *et al.* (2004), han descrito este nuevo género en Sudáfrica que incluye a las especies *C. fasciculare* Schroers, Halleen & Crous y *C. pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous. Se trata de hongos menos frecuentes cuya distribución, hasta la fecha, está limitada a este país.

1.3.3- Taxonomía

El género *Cylindrocarpon*, que fue introducido por primera vez en el año 1913 por Wollenweber (Wollenweber, 1913), pertenece al grupo de los Hongos Mitospóricos. Su forma sexual o teleomorfo corresponde al género *Neonectria* que se ubica dentro de la familia Nectriaceae, orden Hypocreales, clase Ascomycetes (Hawksworth *et al.*, 1995). Si bien *Cylindrocarpon* fue descrito a principios del siglo XX, la primer descripción detallada de este género fue efectuada en los años 60 (Booth, 1966).

Los teleomorfos de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, corresponden a *Neonectria liriodendri* Halleen, Rego & Crous (Halleen *et al.*, 2006b) y *Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers & Crous (Halleen *et al.*, 2004) respectivamente. Tradicionalmente, la forma sexual de todas las especies dentro del género *Cylindrocarpon* era atribuida a *Nectria*, pues todos los teleomorfos cuyas formas anamorfos coincidían con *Cylindrocarpon* spp. se clasificaban dentro de este género. *Nectria* es un género clásico que incluía un elevado número de especies anamorfos. Recientemente, este género fue revisado y dividido en nuevos teleomorfos. De esta manera, todos los representantes de *Nectria* con forma asexual *Cylindrocarpon* spp., fueron transferidos a uno de estos nuevos géneros denominado *Neonectria* Wollenw. La correspondencia *Neonectria-Cylindrocarpon* fue corroborada mediante estudios filogenéticos,

dónde quedo demostrado que *Cylindrocarpon* y *Neonectria* son monofiléticos (Rossman *et al.*, 1999; Mantiri *et al.*, 2001; Braydford *et al.*, 2004).

Morfológicamente el género *Cylindrocarpon* se caracteriza por presentar fiálidas largas. Los conidios, que son hialinos, se originan a partir de estas fiálidas en forma basípeta sin llegar, en general, a formar cadenas. Los macroconidios pueden ser rectos o ligeramente curvados, cilíndricos a fusoides, con los extremos redondeados y con 1 a 10 septos. Los microconidios, si están presentes, también pueden ser rectos o ligeramente curvados, con los extremos redondeados y con 0 a 1 septo. Puede o no formar clamidosporas; éstas se originan en el micelio pero también pueden producirse en los macroconidios; son hialinas a marrones, globosas y pueden estar aisladas, en cadenas o agrupadas y de forma intercalar o terminal. Asimismo, los aislados presentan una gran variabilidad morfológica, las colonias pueden ser blancas, beiges, naranjas, marrones o púrpuras, mientras que el micelio puede ser ralo u algodonoso y puede o no formar esporodoquios (Booth, 1966; Samuels y Brayford, 1990).

Las especies que causan el pie negro de la vid, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, siempre forman microconidios, macroconidios de 1 a 3 tabiques y clamidosporas en el micelio y macroconidios. Asimismo, los aislados dentro de cada una de las especies presentan diferentes colores y texturas. Para diferenciar a *C. liriodendri* de *C. macrodidymum* algunos investigadores afirman que los macroconidios de *C. liriodendri* son levemente más curvados y de menor tamaño que los de *C. macrodidymum* (Halleen *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2006a); sin embargo, en la práctica, esta característica ha resultado poco resolutive para la identificación de ambas especies.

1.3.4- Biología y epidemiología

Las especies del género *Cylindrocarpon* son habitantes comunes en el suelo. La producción de clamidosporas les permite sobrevivir largas temporadas en ausencia de hospedantes. Sin embargo, existe poca información acerca de qué papel tienen exactamente en la supervivencia del hongo y en la infección de las plantas (Booth, 1996; Halleen *et al.*, 2004).

Las especies de este género afectan a un amplio rango de hospedantes herbáceos y leñosos, causando decaimiento y muerte de plantas principalmente jóvenes (Samuels y Brayford, 1990; Halleen *et al.*, 2004). En general, las patologías que causan son de trascendencia menor pero, en algunas ocasiones, provocan daños económicos significativos. Además de plantas de vivero y plantaciones jóvenes de vid, las especies de *Cylindrocarpon* también pueden afectar gravemente a semilleros forestales, especialmente de coníferas, generando importantes pérdidas de plantas (Hamelin *et al.*, 1996). Otro cultivo que puede ser gravemente dañado es el ginseng (*Panax quinquefolius* L.), en el que la especie *C. destructans* causa severas podredumbres de raíz en plántulas y plantas adultas (Reeleder y Brammal, 1994; Mahfusur *et al.*, 2005).

En la vid, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* se aíslan de las raíces, de la madera del portainjerto, principalmente desde la base, y de la zona del injerto (Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler; 2005, Aroca *et al.*, 2006). Estas dos especies infectan a las vides a través de las raíces, pero también pueden ingresar a la planta por la base del portainjerto. Cuando las varetas de los portainjertos son plantados en el suelo de los viveros, el callo de la base sufre pequeñas heridas que actúan como vía de entrada para estos patógenos. En Sudáfrica, la presencia de *Cylindrocarpon* spp. en la zona del injerto, es atribuida a la práctica que efectúan algunos viveros, que consiste en cubrir con suelo durante algunas semanas la planta injertada por encima del injerto para evitar que ésta se deshidrate (Halleen *et al.*, 2003).

Durante el proceso de producción de plantas, el material vegetal puede infectarse en diferentes momentos. Sin embargo, la fase de enraizamiento es considerada la más crítica, pues los niveles de *Cylindrocarpon* pueden incrementarse sustancialmente en este momento. En una investigación conducida en viveros de vid de Sudáfrica, se efectuaron aislamientos de *Cylindrocarpon* spp. a partir de material vegetal en las diferentes etapas durante el proceso de producción de plantas. Previo a la plantación en suelo, las varetas injertadas presentaban un nivel de infección de *Cylindrocarpon* spp. inferior al 1%. Sin embargo, este valor aumentó significativamente después de la plantación, alcanzándose el 50% de plantas afectadas. Los investigadores concluyeron que,

al menos en Sudáfrica, la principal fuente de inóculo del pie negro en los viveros es el suelo (Halleen *et al.*, 2003).

En este sentido, en un trabajo similar efectuado en viveros de España, *Cylindrocarpon* spp. se aisló con aproximadamente igual frecuencia durante todas las etapas del proceso de producción de plantas de vid, alcanzando valores en torno al 20% (Giménez-Jaime *et al.*, 2006).

La presencia de *Cylindrocarpon* spp. en las plantas madres de los portainjertos, que fue confirmada en Sudáfrica, no alcanzó gran trascendencia dado que no se consideró a este material como fuente de inóculo de importancia. *Cylindrocarpon* spp. solo se aisló en un 0,17 % de las muestras evaluadas (Fourie y Halleen, 2004a).

El sistema de producción de plantas de vid, mediante reproducción vegetativa, juega un papel preponderante en la dispersión de la enfermedad, pues *Cylindrocarpon* spp. pueden diseminarse a través de este material. En algunos países como Portugal, se especuló que las plantas de vivero son, con seguridad, el principal origen de las infecciones en el campo. En ocasiones, se ha constatado que las plantas de parcelas afectadas provenían de una misma región o incluso de un mismo vivero (Rego *et al.*, 2000).

En cuanto a la incidencia de esta enfermedad en campo, al tratarse de hongos que habitan comúnmente en el suelo, las plantas también pueden infectarse en el terreno definitivo. Gubler *et al.* (2004) aseguran que las infecciones en el campo pueden depender, entre otros factores, de las condiciones del cultivo. Estos investigadores afirman que, en California, la cantidad de plantas afectadas por *Cylindrocarpon* spp. aumenta sustancialmente cuando la plantación se desarrolla en suelos pesados y/o pobremente drenados.

1.3.5- Medidas de control

Hasta la fecha, las medidas que se han desarrollado para el control del pie negro de la vid se basan principalmente en medidas culturales: utilización de

material vegetal sano y prevención o corrección de las condiciones que puedan causar estrés en las plantas durante los primeros estados de crecimiento y que podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad (riegos excesivos o periodos extensos sin agua, etc.) (Halleen *et al.*, 2006a). Estas medidas contribuyen a que las plantas permanezcan libres de *Cylindrocarpon* durante un período de tiempo más prolongado. Asimismo, las investigaciones que se están desarrollando actualmente, están enfocadas principalmente al saneamiento de las plantas en la etapa de vivero mediante medidas de control químico, físico o biológico.

Control químico

El control químico es una de las alternativas que más se está valorando como medida de control del pie negro de la vid. En este sentido, en varios de los países dónde esta enfermedad es considerada de importancia, se han efectuado experimentos para evaluar la eficacia de los fungicidas existentes en el mercado.

En Portugal, Rego *et al.* (2006), evaluaron catorce fungicidas de diferentes grupos químicos, solos o combinados, para el control de *C. liriodendri*. En este trabajo se midió *in vitro* la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de los conidios. Mientras que *in vivo* se midió el porcentaje de plantas afectadas, el peso de la parte aérea y el número total de raíces. La aplicación de fungicidas se efectuó mediante inmersión de las raíces y la parte basal de varetas enraizadas de vid, en soluciones con los diferentes fungicidas seleccionados. Las varetas fueron luego plantadas en macetas individuales con suelo previamente inoculado con *C. liriodendri* y mantenidas en invernadero durante tres meses.

Los fungicidas procloraz y, en menor medida, benomilo, difeconazol, y las mezclas cyprodinil-fludioxinil y carbendazima-flusilazol fueron los que mostraron mejores resultados en la inhibición del crecimiento micelial. De éstos, sólo cyprodinil-fludioxinil, además de azoxystrobin, trifloxystrobin y tolylfluanida, fueron efectivos en reducir la germinación de conidios. Mientras que, en los resultados sobre plantas, fueron los fungicidas benomilo, tebuconazol y la combinación de carbendazima + flusilazol y cyprodinil + fludioxonil los que

mejoraron el desarrollo de las plantas y disminuyeron la incidencia de la enfermedad comparado con el testigo.

En otro trabajo realizado en Sudáfrica, Fourie y Halleen (2006) evaluaron en viveros semicomerciales diferentes fungicidas, entre otros productos, para el control de *Cylindrocarpon* spp. y otros patógenos de madera de planta joven de vid. Los productos fueron aplicados a varetas de portainjertos en diferentes etapas durante el proceso de producción de plantas: previo al almacenamiento en cámara de frío, previo al injerto y previo a la plantación en el suelo después del injerto. La aplicación consistió en bañar las varetas, mediante inmersión, en las soluciones con los diferentes fungicidas. Luego fueron plantadas en el suelo del vivero, permaneciendo allí durante ocho meses.

Transcurrido este tiempo se valoró la calidad externa de la planta y se efectuaron aislamientos en la base y en la zona del injerto. Los fungicidas benomilo, captan y didecildimetil cloruro amónico fueron consistentemente los mejores en reducir satisfactoriamente la incidencia de los patógenos en las plantas sin afectar su calidad externa. Aunque *Cylindrocarpon* spp. se encontró entre los patógenos aislados de las plantas control, los niveles fueron tan bajos, con valores inferiores al 1,5 %, que no fue posible obtener resultados concluyentes.

Posteriormente, Halleen *et al.* (2007) desarrollaron otra investigación para el control de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. En primer lugar, ensayaron *in vitro* el efecto de trece fungicidas en la inhibición del crecimiento micelial. Benomilo, flusilazol, imazalil y procloraz fueron los más efectivos y, por tanto, fueron incluidos junto con otros productos en ensayos de plantas de vivero en condiciones semicomerciales durante dos temporadas. Después de la formación del callo, la parte basal de varetas de portainjertos injertadas fue sumergida en los diferentes fungicidas y, posteriormente, plantadas.

Después de permanecer siete meses enraizando en el suelo del vivero, se efectuó la evaluación. Por un lado, se valoró la calidad externa de las plantas y por otro, se efectuaron aislamientos en las raíces y en la base del portainjerto. Los resultados indicaron que sólo los fungicidas benomilo e imazalil lograron cierto

control en la incidencia de plantas afectadas por *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* comparado con el control no tratado. Además, los resultados entre los experimentos de las dos temporadas fueron inconsistentes.

Control con termoterapia

El tratamiento con termoterapia es utilizado en muchos patosistemas para sanear material vegetal. En el caso de la vid, se ha ensayado para el control de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* y otros patógenos de planta joven de vid en los viveros.

Halleen *et al.* (2007), valoraron el efecto de tratar el material vegetal con agua caliente. Para ello, se sumergieron varetas enraizadas en estado latente en agua a una temperatura de 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se procedió a realizar aislamientos en las raíces y en la base de los portainjertos. De ninguna de las plantas tratadas se aisló *Cylindrocarpon* spp., mientras al menos el 16,8 % de las plantas control sin tratar estaban infectadas en la base del portainjerto y el 4,1 % en la raíz. Estos investigadores consideran al tratamiento con agua caliente como una medida muy eficiente y viable para el control del pie negro y, proponen, que debería incluirse dentro de una estrategia de manejo integrado en el proceso de producción de plantas en los viveros.

Control biológico

El control biológico suele evaluarse frecuentemente como una opción de control para muchas enfermedades obteniéndose, en algunas oportunidades, resultados satisfactorios. Esta alternativa también ha sido valorada para el control del pie negro de la vid.

Halleen *et al.* (2007), también incluyeron en su investigación un tratamiento biológico para el control del pie negro. El producto utilizado consistió en un formulado comercial del hongo *Trichoderma harzianum*. El tratamiento consistió en la incorporación al suelo del formulado previo a la plantación de las varetas injertadas, y en posteriores riegos mensuales durante siete meses con el mismo producto. También aquí la evaluación se efectuó

determinando la calidad externa de la planta y la incidencia de plantas afectadas a través de aislamientos en la raíz y base del portainjerto. La aplicación del formulado comercial de *T. harzianum*, no fue capaz de mantener el nivel de infección de las plantas tratadas en valores por debajo del tratamiento control sin tratar.

Otras medidas de control

Además de las anteriores, también se han estudiado otras alternativas para controlar el pie negro, como es el caso de la incorporación de diferentes tipos de residuos al suelo, o la utilización de micorrizas.

En el sur de Australia, Stephens *et al.* (1999) estudiaron la incorporación de enmiendas vegetales al suelo para el control de *Cylindrocarpon* spp., entre otros patógenos de suelo que afectan a la vid. Estos investigadores buscaban alternativas para reemplazar el uso de los fumigantes tradicionalmente utilizados en la zona, bromuro de etidio y metam sodio. Los materiales evaluados fueron las crucíferas mostaza india (*Brassica juncea* L.) y canola (*Brassica napus* L.), que fueron incorporadas en cantidades de 12,2 y 9,8 t de materia seca por ha respectivamente. Los resultados mostraron que ninguno de los dos tratamientos fue capaz de alcanzar los niveles de uva de primera calidad que sí se obtenían utilizando bromuro de etidio y metam sodio.

Asimismo, estudios preliminares realizados en Pennsylvania demostraron que la incorporación de compost al suelo sí podría contribuir en la disminución de la cantidad de *C. liriodendri* en suelo. Gugino y Travis (2003), mezclaron suelo con diferentes tipos de compost en cantidades desde 0 a 50 % del volumen total. Los resultados preliminares indicaron que la población de este hongo en el suelo disminuía notoriamente cuanto mayor era el volumen de compost agregado. Asimismo, varios de los microorganismos aislados de estos compost manifestaron actividad antagónica *in vitro* contra *C. liriodendri*.

En cuanto a la utilización de micorrizas, Petit y Gubler (2006) encontraron que, bajo condiciones controladas, las plantas de vid inoculadas con *C. macrodidymum* desarrollaron significativamente menos síntomas en la parte

aérea y en la raíz, si habían sido preinoculadas con *Glomus intraradices*. Esta micorriza colonizó en niveles muy satisfactorios las raíces de las plantas de vid, superando en algunas ocasiones el 50 % de raíces colonizadas. Si bien el mecanismo de acción de esta micorriza no está del todo claro, es posible que mejore el consumo de nutrientes compensando el efecto negativo o decaimiento que causa el patógeno sobre las plantas. Estos investigadores consideran que la aplicación de *G. intraradices* puede ayudar a prevenir la enfermedad del pie negro en los viveros y en las plantaciones definitivas.

Otra opción valorada fue la aplicación de quitosano. Nascimento *et al.* (2007), evaluaron el efecto este producto *in vitro* e *in vivo* para el control de algunos de los hongos patógenos más importantes de la madera de la vid, incluido *C. liriodendri*. El quitosano fue efectivo para reducir el desarrollo miceliar *in vitro* de todos los patógenos evaluados. Sin embargo, en el caso de *C. liriodendri*, las dosis necesarias superaron los niveles recomendados para este producto. En los ensayos *in vivo*, el quitosano se aplicó foliarmente a plantas de vid plantadas en maceta con suelo inoculado con los patógenos a evaluar. El efecto de este producto en el control de *C. liriodendri* fue similar al obtenido por los fungicidas carbendazima + flusilazol, cyprodinil + fludioxonil y tebuconazol.

1.4- SITUACIÓN ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA DE LA VID EN ESPAÑA

Como ya se ha mencionado anteriormente, en España las enfermedades de madera de la vid se han convertido en un problema destacado en los últimos años. Desde la pasada década de los 90 el decaimiento de plantas, sobre todo en plantaciones jóvenes, ha ido incrementándose notoriamente en todas las regiones vitícolas (García-Jiménez, 2004).

Al igual que en otros países del mundo, en España algunas de estas enfermedades son conocidas desde hace bastante tiempo y han sido estudiadas exhaustivamente. Por ejemplo, la yesca fue descrita a principios del siglo XX (Bellod, 1947). Asimismo, la eutipiosis se detectó por primera vez en el año 1979

en viñedos de Badajoz (Arias-Giralda, 1998) y, posteriormente, en otras zonas de cultivo.

Las demás enfermedades son de descripción más reciente. En el caso del brazo muerto, en la prospección efectuada por Armengol *et al.* (2001a y b), se aislaron *B. dothidea* y *Di. seriata* a partir de plantas adultas con síntomas de necrosis sectoriales de consistencia dura y color marrón en el 6,4 % y 61,4 % respectivamente de las parcelas estudiadas. Hoy en día, de las especies de Botryosphaeriaceae que han sido descritas afectando a vid en el mundo, ya han sido citadas en España las anteriormente mencionadas y *Di. mutila*, *N. luteum*, *N. parvum*, *Do. viticola*, *Do. sarmentorum*, *Do. iberica* y *L. theobromae* (Martos y Luque, 2004; Luque *et al.*, 2005; Martin y Cobos, 2007; Aroca *et al.*, 2008).

Armengol *et al.* (2001a y b) también aislaron, mayoritariamente en vides jóvenes, los hongos *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* en el 18,6 % y 26,4 % de las parcelas estudiadas respectivamente, constatándose la creciente importancia de la enfermedad de Petri en nuestro país. Posteriormente, se han encontrado otras especies pertenecientes al género *Phaeoacremonium* afectando a vides jóvenes: *Pm. parasiticum*, *Pm. mortoniae*, *Pm. viticola* y *Pm. scolyti* (Aroca *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2007; Aroca *et al.*, 2008 y Gramaje *et al.*, 2008a).

Sin embargo, hasta la fecha, existe poca información acerca de la enfermedad del pie negro, ni se conoce cuáles son las especies que están presentes en España. Armengol *et al.* (2001a y b) aislaron *Cylindrocarpon* spp. en el 20 % de los viñedos españoles muestreados, siendo este género el segundo en importancia en lo que a patógenos de planta joven se refiere. En trabajos más recientes, se ha confirmado la importancia de *Cylindrocarpon* spp. en los viveros y en las plantaciones jóvenes. Especies de este género se han encontrado en los viveros afectando los materiales de propagación, desde las primeras etapas de producción hasta la planta preparada para la venta. (Aroca *et al.*, 2006; Giménez-Jaime *et al.*, 2006). También se ha detectado una elevada presencia en plantaciones jóvenes con síntomas de decaimiento en Castilla-La Mancha (Armengol *et al.*, 2005). En todos los casos, *Cylindrocarpon* spp. se aislaron a partir de los portainjertos, preferentemente desde la base de los mismos.

Asimismo, en ninguno de estos estudios se llegó a determinar cuál o cuáles eran las especies que estaban afectando a las vides.

CAPÍTULO 2

.....

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

En esta Tesis se plantean cuatro objetivos principales que serán desarrollados en Capítulos independientes. Con ellos se pretende abordar diferentes aspectos relacionados con la enfermedad del pie negro de la vid causada por *Cylindrocarpon* spp. en España.

- 1) Caracterizar una colección de aislados españoles de *Cylindrocarpon* obtenidos de plantas vid mediante estudios fenotípicos, moleculares y de patogenicidad.
- 2) Analizar la diversidad genética y de virulencia en las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.
- 3) Detectar la posible infección por micovirus en aislados de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.
- 4) Estudiar el efecto *in vitro* de diferentes fungicidas o de tratamientos con agua caliente en el control de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

CAPÍTULO 3

.....

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA,
MOLECULAR y PATOGÉNICA DE
Cylindrocarpon spp.**

3- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE *Cylindrocarpon* spp.

3.1- ANTECEDENTES

El pie negro, causado por especies del género *Cylindrocarpon*, es una de las enfermedades que se ha relacionado con el decaimiento y muerte de plantas jóvenes de vid observado en los últimos años. Esta enfermedad afecta principalmente a plantas en viveros y a viñedos jóvenes en las diferentes regiones productoras de vid en el mundo, incluida España. Si bien el pie negro fue descrito por primera vez en los años 60 (Maluta y Larignon, 1991), es en los últimos años cuando comienza a ser estudiado en profundidad a causa de las pérdidas económicas que está generando.

En países como Portugal, Sudáfrica y en California, se han desarrollado líneas de investigación dirigidas al estudio del pie negro de la vid. En ellas, se han efectuado prospecciones en viveros y viñedos y se ha estudiado la etiología de la enfermedad. Asimismo, se ha confirmado la patogenicidad de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* a vid (Rego *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005).

En España, si bien se ha constatado la importancia del pie negro y del género *Cylindrocarpon* en los viveros y en las plantaciones jóvenes (Armengol *et al.*, 2001a y b; Aroca *et al.*, 2006; Giménez-Jaime *et al.*, 2006), no se conoce todavía qué especies están presentes ni su importancia relativa. Por tal motivo, en este Capítulo se pretende identificar y caracterizar las especies de *Cylindrocarpon* que están afectando a la vid en este país.

3.2- MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1- Aislados fúngicos

En esta investigación se utilizaron 82 aislados de *Cylindrocarpon*, que fueron obtenidos de plantas de vid con síntomas de pie negro procedentes de viveros o plantaciones, mayoritariamente de menos de seis años de edad, durante los años 2001 a 2004. Las muestras provenían de 12 provincias y más de 37 localidades. Adicionalmente, se utilizaron cuatro aislados de referencia de *C. liriodendri* y uno de *C. macrodidymum* de vid, procedentes de la colección del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda), o cedidos por la Dra. Cecilia Rego (Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” Lisboa, Portugal), para compararlos con los españoles. La descripción detallada de los aislados aparece en la Tabla 3.1.

Para realizar los aislamientos, se cortaron fragmentos de las zonas afectadas (portainjerto y/o injerto), se esterilizó su superficie sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (1,5 % cloro activo) durante dos minutos, y se enjuagaron posteriormente con agua estéril. A continuación, se sembraron pequeños fragmentos de las lesiones en medio de cultivo agar extracto de malta (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants., Inglaterra) con adición de 0,5 g L⁻¹ de sulfato de estreptomycin (MEAS), y se incubaron durante 5 a 10 días a 25 °C en oscuridad. Las colonias crecidas se repicaron a medio agar patata dextrosa (PDA) (Biokar Diagnostic, Solabia, Francia) y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones. La identificación del género *Cylindrocarpon* se basó en el aspecto de las colonias, la conidiogénesis y la morfología de los conidios (Booth, 1966; Samuels y Braydford, 1990).

De cada uno de los aislados se obtuvieron cultivos monospóricos mediante la técnica de las diluciones sucesivas (Dhingra y Sinclair, 1995), que fueron conservados de dos formas: a -80 °C en crioviales con una solución de glicerol al 15 %, y a -20 °C en papel de filtro deshidratado con silica gel. Estos aislados fueron utilizados posteriormente en los diferentes estudios.

3.2.2- Análisis fenotípico

Morfología

Tabla 3.1. Aislados de *Cylindrocarpon* spp. de vid estudiados.

Especie ^s	Código de aislado ^y		Año	Origen geográfico		Zona de aislamiento		Variedad/ portainjerto
	Código	de aislado ^y		Localidad ^z	Provincia	en la planta		
<i>C. liriodendri</i>	Cy 18		2002	Daimiel	Ciudad Real	portainjerto		Tempranillo/110 R
	Cy 21		2002	Larero	La Rioja	portainjerto		Tempranillo/110 R
	Cy 23		2002	Campo de Criptana	Ciudad Real	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 36		2002	Iniesta	Cuenca	portainjerto		Cencibel/1103 P
	Cy 37		2002	Villanueva de Alcardete	Toledo	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 38		2002	Villanueva de Alcardete	Toledo	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 39		2002	Herencia	Ciudad Real	portainjerto		Tempranillo/110 R
	Cy 58		2003	Cózar	Ciudad Real	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 59		2003	Tarazona de la Mancha	Albacete	portainjerto		Cencibel/1103 P
	Cy 64		2003	Badajoz	Badajoz	portainjerto		Pardino/s/d
	Cy 66		2003	Villarobledo	Albacete	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 67		2003	Tarazona de la Mancha	Albacete	portainjerto		Tempranillo/110 R
	Cy 69		2003	Almáguer	Toledo	portainjerto		Tempranillo/41-B M
	Cy 72		2003	Xátiva	Valencia	portainjerto		Monastrell/110 R
	Cy 80		2003	Aielo de Malferrit	Valencia	portainjerto		s/d
	Cy 85		2003	Fontaneres	Valencia	portainjerto		Tempranillo/161-49 C
	Cy 87		2004	Aielo de Malferrit	Valencia	portainjerto		Macabeo/110 R
	Cy 88		2004	Aielo de Malferrit	Valencia	portainjerto		Macabeo/110 R
	Cy 89		2004	Aielo de Malferrit	Valencia	portainjerto		Garnacha/110 R
	Cy 90		2004	Aielo de Malferrit	Valencia	portainjerto		Garnacha/110 R
	Cy 91		2004	Tarazona de la Mancha	Albacete	portainjerto		Cabernet /1103 P
	Cy 93		2004	Villamayor de Santiago	Cuenca	portainjerto		Cencibel/110 R
	Cy 94		2004	Calzada de Calatrava	Ciudad Real	portainjerto		Tempranillo/110 R
	Cy 97		2004	Haró	La Rioja	portainjerto		Tempranillo/110 R

(continúa en la página siguiente)

Tabla 3.1. (Continúa de la página anterior)

Especie*	Código de aislado ^y	Año	Origen geográfico		Zona de aislamiento		Variedad/ portainjerto	
			Localidad	Provincia	en la planta			
					aislamiento	portainjerto		
<i>C. litrodendri</i> (continúa)	Cy 99	2004	Monóvar	Alicante	portainjerto	portainjerto	Syrah/1103 P	
	Cy 100	2004	Alessanco	La Rioja	portainjerto	portainjerto	Garnacha/110 R	
	Cy 13 Portugal	1995		Portugal	portainjerto	portainjerto	99 R	
	Cy 15 Portugal	1995		Portugal	portainjerto	portainjerto	99 R	
	CBS 117640, IMI 57400	1992		Portugal	portainjerto	portainjerto	Seara Nova /99 R	
	CBS 117526	1999		Portugal	portainjerto	portainjerto	99 R	
	Cy 1	2001	s/d ^z		Alicante	portainjerto	portainjerto	Aledo/1103 P
	Cy 2	2001	Autol		La Rioja	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R
	Cy 3	2001	Autol		La Rioja	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R
	Cy 9	2001	L'Alcudia		Valencia	portainjerto	portainjerto	s/d
Cy 12	2002	Villafranca de Caballeros		Toledo	portainjerto	portainjerto	Cencibel/110 R	
Cy 14	2002	s/d		Burgos	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R	
Cy 15	2002	s/d		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R	
Cy 16	2002	s/d		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R	
Cy 17	2002	La Solana		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/1103 P	
Cy 19	2002	Villarubia de los Ojos		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R	
Cy 22	2002	Tomelloso		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/140 Ru	
Cy 25	2002	s/d		Murcia	portainjerto	portainjerto	s/d	
Cy 28	2002	Monóvar		Alicante	portainjerto	portainjerto	Monastrell/s/d	
Cy 29	2002	Monóvar		Alicante	portainjerto	portainjerto	Monastrell/s/d	
Cy 32	2002	Daimiel		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	s/d	
Cy 33	2002	Daimiel		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	s/d	
Cy 34	2002	Granja de Iniesta		Cuenca	portainjerto	portainjerto	Cabernet Sauvignon/110 R	
Cy 40	2002	Carrión de Calatrava		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Cencibel/110 R	

(continúa en la página siguiente)

Tabla 3.1. (Continúa de la página anterior)

Especie ^s	Código de aislado ^s	Año	Origen geográfico		Provincia	Zona de aislamiento en la planta		Variedad/ portainjerto ^z
			Localidad ^r			aislamiento en la planta	Variedad/ portainjerto ^z	
			Localidad ^r	Provincia				
<i>C. macrodimum</i>	Cy 41	2002	Carrion de Calatrava		Ciudad Real	portainjerto	Cencibel/110 R	
	Cy 42	2002	Villar del Arzobispo		Valencia	portainjerto	Garnacha/161-49 C	
	Cy 43	2002	Ejea de los Caballeros		Zaragoza	portainjerto	s/d	
	Cy 45	2002	Herencia		Ciudad Real	portainjerto	Tempranillo/110 R	
	Cy 47	2003	Mollina		Málaga	portainjerto	Pedro Ximénez/1103 P	
	Cy 48	2003	Mollina		Málaga	portainjerto	Pedro Ximénez/140 Ru	
	Cy 49	2003	Mollina		Málaga	portainjerto	Pedro Ximénez/140 Ru	
	Cy 57	2003	Mollina		Málaga	portainjerto	Cabernet Franc/s/d	
	Cy 60	2003	Campo de Criptana		Ciudad Real	portainjerto	Tempranillo/ s/d	
	Cy 61	2003	Pozuelo de Calatrava		Ciudad Real	injerto	Tempranillo/161-49 C	
	Cy 62	2003	Quero		Toledo	portainjerto	Tempranillo/110 R	
	Cy 63	2003	Daimiel		Ciudad Real	portainjerto	Cencibel/110 R	
	Cy 65	2003	Membrilla		Ciudad Real	injerto	Cencibel/110 R	
	Cy 68	2003	Almaguer		Toledo	portainjerto	Tempranillo/41-B M	
	Cy 70	2003	Quero		Toledo	portainjerto	161-49 C	
	Cy 71	2003	Beniganim		Valencia	portainjerto	161-49 C	
	Cy 73	2003	Fuente de la Higuera		Valencia	portainjerto	41-B M	
	Cy 74	2003	Anna		Valencia	portainjerto	Tempranillo/41-B M	
	Cy 75	2003	Xátiva		Valencia	portainjerto	Tempranillo/41-B M	
	Cy 76	2003	Anna		Valencia	portainjerto	1103 P	
	Cy 77	2003	Aielo de Malferit		Valencia	portainjerto	161-49 C	
	Cy 78	2003	Alfarrasi		Valencia	portainjerto	1103 P	
	Cy 79	2003	Albaida		Valencia	portainjerto	140 Ru	
	Cy 81	2003	Beneixama		Alicante	portainjerto	Tempranillo/161-49 C	

(continúa en la página siguiente)

Tabla 3.1. (Continúa de la página anterior)

Especie ^a	Código de aislado ^b	Año	Origen geográfico		Provincia	Zona de aislamiento en la planta		Variedad/ portainjerto
			Localidad ^c					
<i>C. macroditymum</i>	Cy 82	2003	Xàtiva		Valencia	portainjerto	portainjerto	Syrah/110 R
	Cy 83	2003	Fontanares		Valencia	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/161-49 C
	Cy 84	2003	Aielo de Malferit		Valencia	portainjerto	portainjerto	140 R
	Cy 86	2004	Mollina		Málaga	portainjerto	portainjerto	Pedro Ximénez/110 R
	Cy 92	2004	Alcázar de San Juan		Ciudad Real	portainjerto	portainjerto	Cencibel/161-49 C
	Cy 95	2004	Alcázar de San Juan		Toledo	portainjerto	portainjerto	Moscatel/Gravesac
	Cy 96	2004	Lillo		Toledo	portainjerto	portainjerto	1103 P
	Cy 98	2004	Turis		Valencia	portainjerto	portainjerto	Monastrell/161-49 C
	Cy 101	2004	Alesanco		La Rioja	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R
	Cy 102	2004	Haro		La Rioja	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/110 R
	Cy 103	2004	Villar del Arzobispo		Valencia	portainjerto	portainjerto	Merseguera/s/d
	Cy 104	2004	Fuendejalón		Zaragoza	portainjerto	portainjerto	Cabernet Sauvignon/s/d
	Cy 105	2004	Fuendejalón		Zaragoza	portainjerto	portainjerto	Merlot/110 R
	Cy 106	2004	Almansa		Albacete	portainjerto	portainjerto	Tempranillo/s/d
	CBS 112609	1979	Australia			portainjerto	portainjerto	Cabernet Sauvignon/s/d

^x las especies fueron identificadas mediante el estudio del gen de la β -tubulina, la región ITS y las variables fenotípicas.

^y los aislados de referencia de *C. lirioidendri* (CBS 117640, CBS 117526, Cy 13 Portugal y Cy 15 Portugal) y *C. macroditymum* (CBS 112609) fueron obtenidos de la colección del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda) o proporcionados por la Dra. Cecilia Rego (Laboratório de Patologia Vegetal “Verissimo de Almeida”, Lisboa, Portugal).

^z s/d sin dato.

Todos los aislados se hicieron crecer en tres medios de cultivo diferentes: PDA, spezieller nährstoffarmer agar (SNA) con adición de dos fragmentos de 1,5 x 1,5 cm de papel de filtro estéril y extracto de agar malta al 2 % (MEA 2 %) (Difco, Sparks, MD, USA). Las colonias se incubaron durante 10 días en PDA y SNA y 6 días en MEA 2 %. En todos los casos se mantuvieron a 25 °C y 12 horas de fotoperíodo con luz ultravioleta cercana (Philips TDL18W/08) más iluminación fluorescente (Philips TDL18W/33).

En PDA se evaluaron aspectos morfológicos tales como color del anverso y reverso de la colonia (Rayner, 1970), tipo de margen de crecimiento, textura o zonación. Estas colonias se incubaron luego durante 20 días más para determinar la presencia-ausencia de clamidosporas, midiendo en su caso el diámetro de 20 clamidosporas por aislado. En SNA se midieron la longitud y anchura de un total de 50 microconidios y macroconidios, incluyendo los de 0, 1, 2 y 3 tabiques, mediante microscopio óptico a 400 x de amplificación. En MEA 2 % se registró el color del anverso de las colonias (Rayner, 1970; Petit y Gubler, 2005).

Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar

Para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento radial de las colonias, se sembraron discos de agar con micelio de 5 mm de diámetro en el centro de placas Petri con medio de cultivo PDA, realizando 4 repeticiones por cada aislado. Las placas se hicieron crecer a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C en oscuridad durante 10 días, tras los cuales se midieron dos diámetros perpendiculares por placa. Con estos datos se calculó el ratio de crecimiento diario de cada aislado en mm día⁻¹. El experimento se repitió dos veces.

Capacidad de esporulación de los aislados

La capacidad de esporulación de los aislados se determinó en base a la metodología descrita por Whiting *et al.* (2001). Cada aislado se sembró en cuatro placas de medio de cultivo PDA y se incubaron durante 7 días en oscuridad a 25 °C. De cada placa se extrajeron dos discos de agar de 4 mm de diámetro de

zonas opuestas del margen de crecimiento de la colonia, introduciendo cada uno de ellos en tubos Eppendorf de 1,5 mL, que contenían 1 mL de agua destilada estéril. Los tubos se agitaron durante 5 segundos con un agitador vórtex e inmediatamente se contabilizó el número de conidios mL⁻¹ utilizando un hematocitómetro. El experimento se repitió dos veces.

Complementación sexual

Para el estudio de la complementación sexual, se seleccionaron diez aislados representativos de diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas de cada una de las dos especies identificadas, *C. liriiodendri* y *C. macrodidymum*. En *C. liriiodendri* éstos fueron Cy 36, Cy 38, Cy 59, Cy 64, Cy 67, Cy 85, Cy 94, Cy 97, Cy 99 y el aislado de referencia CBS 117526; mientras que en *C. macrodidymum* se seleccionaron los aislados Cy 1, Cy 14, Cy 32, Cy 47, Cy 63, Cy 74, Cy 96, Cy 102, Cy 104 y el aislado de referencia CBS 112609.

Dentro de cada especie todos los aislados se cruzaron entre sí y todos los aislados de una especie con todos los de la otra. Los cruzamientos se efectuaron en medio de cultivo agar agua (AA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) con adición de tres acículas de pino en la superficie (HJ Schroers *comunicación personal*) formando una “N” (Guerber y Correll, 2001). Los aislados se sembraron de manera que quedaran opuestos a las acículas de pino, efectuándose dos repeticiones por cada cruzamiento. Las placas se incubaron a 23 °C y 12 horas de fotoperíodo con luz ultravioleta cercana (Philips TDL18W/08) más iluminación fluorescente (Philips TDL18W/33) durante dos meses. Semanalmente se efectuaban observaciones, con ayuda de lupa y microscopio, para detectar la posible formación de peritecios con ascosporas viables. Para determinar la viabilidad de las ascosporas, éstas se depositaron en un portaobjeto con agua y se mantuvieron durante 24 horas en cámara húmeda a 25 °C, considerándolas viables si germinaban al cabo de este tiempo.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los estudios fenotípicos se analizaron estadísticamente mediante un análisis factorial multivariante (Peña, 2002),

utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). En el análisis se incluyeron las siguientes variables: longitud y anchura de los conidios de 0, 1, 2 y 3 tabiques, tamaño de las clamidosporas, ratio de crecimiento diario a las temperaturas evaluadas 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C y \log_{10} del número de conidios mL^{-1} .

3.2.3- Análisis molecular

Extracción de ADN

El ADN genómico de todos los aislados se obtuvo a partir de micelio y esporas de colonias crecidas durante dos semanas en placas con medio PDA a 25 °C en oscuridad. Cada colonia se raspó mecánicamente con una espátula, el micelio y las esporas se mezclaron con nitrógeno líquido en un mortero y se trituraron con ayuda de una maza. Para la extracción se utilizó el kit E.Z.N.A.[®] Plant DNA Miniprep (Omega Bio-tek, U.S.A.) siguiendo las indicaciones de su protocolo. El ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa (agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 0,7 %. El resto de ADN se almacenó a -20 °C.

Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se analizaron tres regiones dentro del genoma. Éstas fueron amplificadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la primera región se utilizó la pareja de cebadores Dest1/Dest4, específicos para *C. destructans*, que amplifican un sector interno de la región ITS (espaciadores transcritos internos) (Hamelin *et al.*, 1996) mediante amplificaciones directas del ADN genómico (Nascimento *et al.*, 2001). En la segunda se amplificó una secuencia parcial del gen de la β -tubulina, BT1, utilizando el par de cebadores BT1a/BT1b (Glass y Donaldson, 1995). Finalmente en la tercera, se amplificó la región 5,8S-ITS que comprende las secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 y el gen 5,8S que codifica para el ARNr, con los cebadores universales ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). En este último caso sólo se amplificó una selección de 37 aislados representativos de diferentes orígenes geográficos y

características fenotípicas y los cinco aislados de referencia de ambas especies. La descripción detallada de los cebadores se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Pares de cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones del genoma de *Cylindrocarpon* spp. para los estudios moleculares.

Gen o región	Cebador	Secuencias (5' a 3')	Referencia
Sector interno de la región ITS	Dest1	TTG TTG CCT CGG CGG TGC CTG	Hamelin <i>et al.</i> , 1996
	Dest4	GGT TTA AGC GCG TGG CCG CGC TGT T	
Región BT1 del gen de la β -tubulina	BT1a	TTC CCC CGT CTC CAC TTC TTC ATG	Glass y Donaldson, 1995
	BT1b	GAC GAG ATC GTT CAT GTT GAA CTC	
Región 5,8S-ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCC TCC CGT TAT TGA TAT GC	

En todos los casos, la mezcla de reacción contenía 1x de tampón, $MgCl_2$ 2,5 mM, 200 μM de cada uno de los dNTPs, 0,4 μM de cada uno de los cebadores, 1U de ADN-polimerasa (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μl de la solución del ADN extraído. La mezcla se ajustó con agua (Chromasolv[®] Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a un volumen final de 25 μl . Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador modelo Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). Los programas consistieron en un primer paso de 94 °C durante 4 minutos para la desnaturalización, seguido por 35 ciclos (30 en el caso de Dest1/Dest4) a 94 °C durante 1 minuto, 58 °C durante 1 minuto (55 °C en el caso de ITS1/ITS4) y 72 °C por 1,5 minutos y, finalmente, 72 °C durante 10 minutos para completar las extensiones.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 1,5 %, preparado con tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH = 8,0). El marcador de peso molecular utilizado fue una mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (Gene Ruler[™] 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Alemania). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con bromuro de etidio a una concentración de

200 $\mu\text{L L}^{-1}$ de agua y se expusieron en un equipo de fotodocumentación de geles (Gelprinter plus, TDI, Madrid, España).

Secuenciación y filogenia de la β -tubulina y de la región ITS

Los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores BT1a/BT1b e ITS1/ITS4 se purificaron utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche, Mannheim, Alemania), y se secuenciaron en ambas direcciones con los mismos cebadores en el servicio de secuenciación de ADN de la Universidad Politécnica de Valencia-CSIC. Las secuencias fueron primero editadas utilizando los programas DNAMAN (Versión 4.03 Lynnon BioSoft, Québec, Canadá) y Chromas (Versión 2.32 Technelysium Pty Lda, Australia) y, luego, alineadas con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, se calcularon las distancias genéticas con el modelo 2-parámetros de Kimura que asume que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma y que la tasa de sustitución no varía entre sitios (Kimura, 1980). A continuación, se efectuó un análisis de “bootstrap” de 1000 repeticiones y se construyó un árbol filogenético para cada una de las zonas analizadas, BT1 del gen de la β -tubulina y región ITS utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

En cada alineamiento se incluyeron secuencias adicionales de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum* que se obtuvieron de la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S.A.). En el alineamiento de la β -tubulina, las secuencias de *C. lirioidendri* agregadas fueron AY997601 y AY997602 de aislados originarios de California y AY997587 de Francia, y de *C. macrodidymum* AY997608 y AY997619 de California y AY997604 de Chile. Mientras que en el alineamiento de la región ITS de *C. lirioidendri* éstas fueron AY677267 de Sudáfrica, AY997533 de Francia y AY997547 de California, y de *C. macrodidymum* AY677287 de Sudáfrica, AY997550 de Chile y AY997556 de California.

3.2.4- Patogenicidad

Para estudiar la patogenicidad de los aislados se efectuaron dos experimentos distintos. En el primero de ellos, el objetivo era determinar las concentraciones de inóculo que puedan producir infecciones en las raíces y parte basal del portainjerto que causen la manifestación externa de los síntomas del pie negro, y que sean adecuadas para ser utilizadas en ensayos de patogenicidad. Para ello, barbados enraizados de vid se inocularon con suspensiones de conidios de diferentes concentraciones. En *C. liriodendri* las concentraciones evaluadas fueron 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 conidios mL^{-1} , mientras que en *C. macrodidymum* sólo se evaluaron las tres primeras puesto que no fue posible alcanzar la concentración más elevada en esta especie. Para la inoculación se seleccionaron tres aislados de *C. liriodendri*: Cy 59, Cy 64 y Cy 85; y tres de *C. macrodidymum*: Cy 1, Cy 14 y Cy 63.

En el segundo experimento, se efectuó un estudio de patogenicidad de una selección más amplia de aislados de ambas especies, doce en total. Para *C. liriodendri* éstos fueron Cy 36, Cy 59, Cy 64, Cy 72, Cy 85 y Cy 88, mientras que en *C. macrodidymum* fueron Cy 1, Cy 14, Cy 32, Cy 63, Cy 96 y Cy 104. En este caso, la concentración de inóculo utilizada se eligió en base a los resultados del primer experimento, siendo de 10^6 conidios mL^{-1} .

En ambos ensayos, todos los aislados se hicieron crecer en medio PDA durante un mes a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Para preparar el inóculo, a cada placa se le agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) y se raspó mecánicamente la superficie con una espátula. La suspensión de conidios se filtró a través de una malla, se diluyó con ADE, y se ajustó a las diferentes concentraciones midiendo con un hematocitómetro. El material vegetal utilizado fue barbados enraizados en estado latente de ocho meses de edad del cultivar 110 R. Previo a la inoculación, las raíces fueron recortadas y desinfectadas su superficie mediante inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante dos minutos y enjuagadas con ADE dos veces. Por cada aislado y concentración se inocularon ocho barbados sumergiendo sus raíces en la suspensión de conidios durante 30 minutos. Las plantas control se sumergieron en ADE. Inmediatamente, todas las plantas se plantaron en macetas individuales de 15 cm de diámetro que contenían turba estéril, y se colocaron en un invernadero de temperatura controlada entre $25\text{ }^\circ\text{C}$ y

30 °C y dispuestas según un diseño al azar. Para garantizar la infección, transcurrido un mes desde la inoculación y plantación, cada planta fue inoculada nuevamente mediante un riego de 40 ml con una solución de igual concentración de conidios, o con ADE en el caso de las plantas control.

Cuatro meses después de la plantación, todas las plantas fueron arrancadas y sus raíces limpiadas cuidadosamente. Los síntomas o daños en las raíces se evaluaron siguiendo una escala de síntomas de 0 a 5; donde 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 10 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 10 a 25 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 25 a 50 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con más del 50 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta. También se evaluó el peso seco de la raíz y de la parte aérea. Para aislar los hongos inoculados, a partir de las raíces con síntomas se efectuaron aislamientos en medio MEAS, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Cada experimento se repitió dos veces.

Análisis estadístico

Los datos de índice de daño de la raíz fueron analizados mediante el procedimiento GENMOD utilizando una distribución multinomial y el “cumulative logic” de la función “link” en el programa SAS (SAS Institut Inc., Cary, NC, USA). Los valores de las medias se separaron mediante el test de χ^2 con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para el análisis del peso seco de la raíz y de la parte aérea, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Los valores de las medias se separaron mediante el test de diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. La comparación entre las dos especies se efectuó mediante contrastes lineales de un grado de libertad (Mead *et al.*, 2003) utilizando estos mismos programas. Previamente, utilizando estos mismos métodos de análisis, se compararon estadísticamente los resultados de los dos ensayos en ambos experimentos, para poder analizarlos conjuntamente en caso de no existir diferencias significativas. En el primer experimento, se compararon también los resultados de los tres aislados dentro de cada especie con el mismo objetivo.

3.3- RESULTADOS

3.3.1- Análisis fenotípico

El color y aspecto de las colonias crecidas en PDA fue muy variable. En el anverso mostraron coloraciones blancas, amarillo suave a amarillo fuerte, verde, rosa y diferentes tonos de marrón; mientras que en el reverso se observaron diferentes tonos de amarillo, naranja y marrón. En cuanto al margen de crecimiento, se observaron tres tipos: entero, ligeramente lobulado y lobulado. La textura era algodonosa a algodonosa suave, con presencia de zonaciones en algunos casos (Figura 3.1, Anexo 1). El color del reverso en MEA 2 % fue variable con diferentes tonalidades de amarillo, naranja y marrón (Anexo 1).

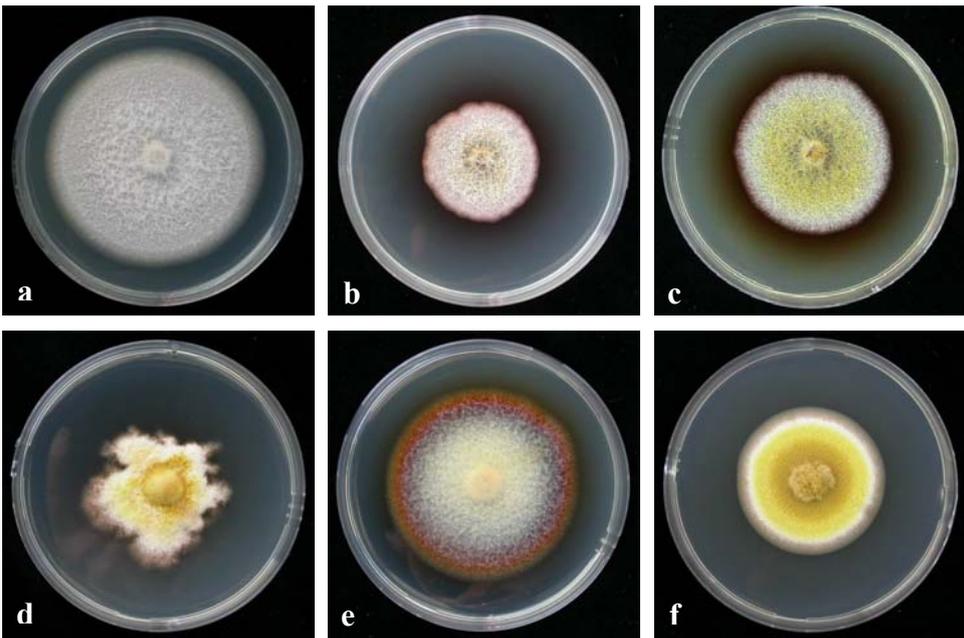


Figura 3.1. Aspecto del anverso de algunas de las colonias de *Cylindrocarpon* spp. crecidas en medio PDA tras 10 días de incubación a 25 °C y 12 horas de fotoperíodo con luz ultravioleta cercana más iluminación fluorescente; a), b) y c) aislados Cy 23, Cy 36 y Cy 100 de *C. liriodendri* respectivamente; d), e) y f) aislados Cy 9, Cy 62 y Cy 78 de *C. macrodidymum* respectivamente.

Todos los aislados produjeron conidióforos largos, microconidios y macroconidios de 1 a 3 tabiques, y clamidosporas terminales e intercalares que en algunas ocasiones se presentaban agrupadas en cadenas. Los tipos de conidios y clamidosporas así como sus tamaños fueron coincidentes con los descritos en la bibliografía para el género *Cylindrocarpon* (Booth, 1966; Samuels y Brayford, 1990) (Figura 3.2, Anexo 2).

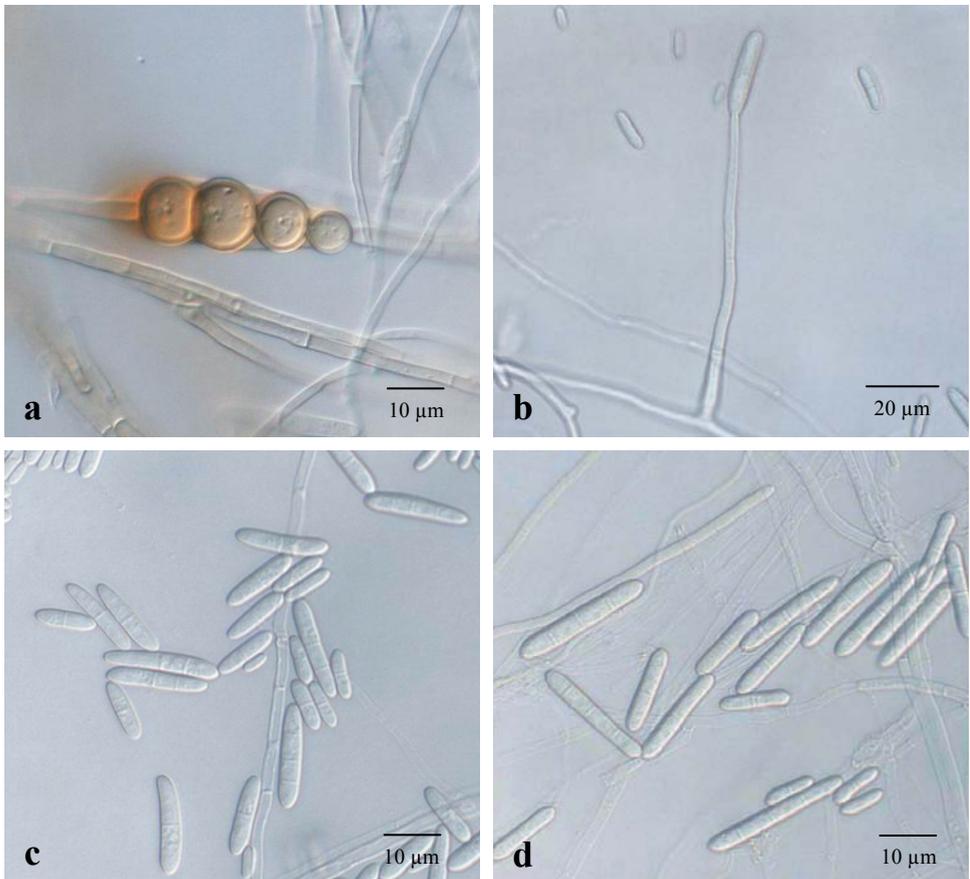


Figura 3.2. Aspecto de algunas de las estructuras de *Cylindrocarpon* spp. en colonias crecidas en medio PDA; a) clamidosporas en cadena de *C. macrodidymum*; y en medio SNA; b) conidióforo de *C. liriodendri*, c) conidios de *C. liriodendri*, d) conidios de *C. macrodidymum*.

Todos los aislados crecieron a todas las temperaturas evaluadas excepto a 35 °C, situándose el óptimo de crecimiento entre los 20 y 25 °C. Las placas incubadas a 35 °C, se mantuvieron luego durante 7 días a 25 °C, comprobándose que la mayoría de los aislados habían muerto. La medición de la capacidad de esporulación de los aislados mostró una gran variabilidad, obteniéndose valores comprendidos entre 13 conidios mL⁻¹ y 2.217.500 conidios mL⁻¹.

Las dos especies desarrollaron estructuras de reproducción sexual y en condiciones heterotálicas. En siete de los cruzamientos efectuados dentro de la especie *C. liriodendri*, se observaron peritecios con ascas y ascosporas en su interior correspondientes a *Neonectria liriodendri* (Tabla 3.3), mientras en la especie *C. macrodidymum* sólo en uno de los cruzamientos fue posible encontrar estas estructuras que se corresponden, en este caso, a *Neonectria macrodidyma* (Tabla 3.4). En ambos casos, los peritecios, que eran de color rojo, aparecían solos o agrupados y se ubicaban en la superficie del agar, sumergidos en éste, o apoyados en las acículas de pino. En el interior de los peritecios se observaron las ascas que contenían ascosporas hialinas, alargadas, y con un tabique central transversal. En todos los casos las ascosporas resultaron viables. En ninguno de los cruzamientos entre las dos especies se formaron estructuras sexuales de ningún tipo (datos no mostrados). En la Figura 3.3 pueden observarse algunos detalles de las estructuras de *N. liriodendri*.

Tabla 3.3. Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de *C. liriodendri* seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas.

Aislados	CBS 117526	Cy 36	Cy 38	Cy 59	Cy 64	Cy 67	Cy 85	Cy 94	Cy 97	Cy 99
CBS117526	-									
Cy 36	-	-								
Cy 38	-	-	-							
Cy 59	-	+	-	-						
Cy 64	-	-	-	-	-					
Cy 67	-	-	-	-	-	-				
Cy 85	-	+	-	-	-	-	-			
Cy 94	+	-	-	-	-	-	-	-		
Cy 97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cy 99	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-

+/- indica presencia/ausencia de peritecios tras dos meses de incubación.

Tabla 3.4. Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de *C. macrodidymum* seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas.

Aislados	CBS 112609	Cy 1	Cy 14	Cy 32	Cy 47	Cy 63	Cy 74	Cy 96	Cy 102	Cy 104
CBS112609	-									
Cy 1	-	-								
Cy 14	-	-	-							
Cy 32	-	-	-	-						
Cy 47	-	-	-	-	-					
Cy 63	-	-	-	-	-	-				
Cy 74	-	-	-	-	-	-	-			
Cy 96	-	-	+	-	-	-	-	-		
Cy 102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cy 104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+/- indica presencia/ausencia de peritecios tras dos meses de incubación.

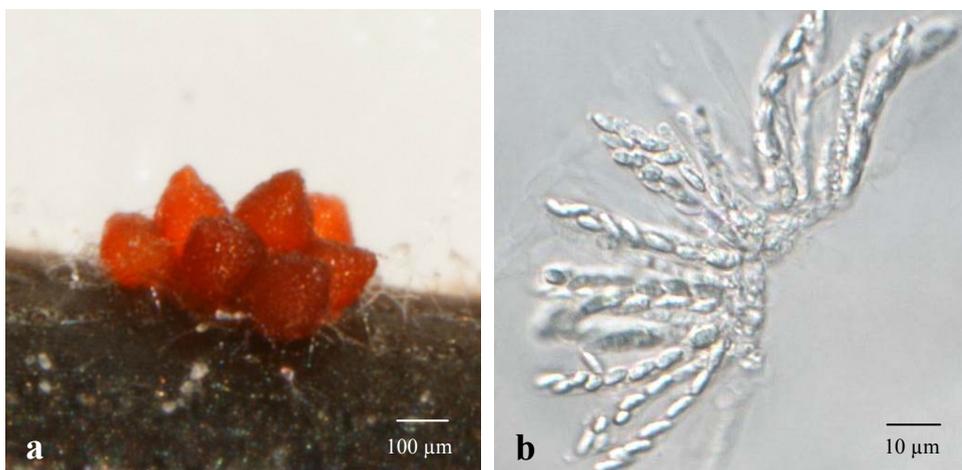


Figura 3.3. Aspecto de algunas de las estructuras de *Neonectria liriodendri* después de dos meses de cultivo en medio AA con adición de acículas de pino; a) peritecios agrupados sobre acícula de pino y b) ascas con ascosporas.

Del análisis estadístico factorial multivariante de los datos fenotípicos, se seleccionaron los dos factores que presentaron los valores propios más altos, éstos fueron 7,03 y 2,28 respectivamente. Ambos explicaron el 58,3 % de la variabilidad total, 44,0 % y 14,3 % respectivamente. Las variables con mayor influencia en el factor 1 correspondieron a la cantidad de conidios mL⁻¹ y el ratio de crecimiento diario a las temperaturas de 5 y 10 °C, mientras que las variables con mayor influencia en el factor 2 fueron la longitud y la anchura de los conidios de 1, 2 y 3 tabiques (Tabla 3.5, Figura 3.4).

Tabla 3.5. Variables analizadas en los factores 1 y 2 extraídos del análisis factorial multivariante.

VARIABLES ANALIZADAS	Factor 1	Factor 2
Log ₁₀ conidios mL ⁻¹	0,809333*	-0,069914
Crecimiento diario a 5 °C	0,899077*	-0,248582
Crecimiento diario a 10 °C	0,913733*	-0,212563
Crecimiento diario a 15 °C	0,674998	-0,234995
Crecimiento diario a 20 °C	0,241948	-0,183932
Crecimiento diario a 25 °C	-0,132501	0,044135
Crecimiento diario a 30 °C	0,505865	0,127111
Longitud de los microconidios	-0,734763	0,393431
Anchura de los microconidios	-0,733337	0,432814
Longitud de los macroconidios de 1 tabique	-0,203174	0,804342*
Anchura de los macroconidios de 1 tabique	-0,152505	0,732897*
Longitud de los macroconidios de 2 tabiques	-0,457782	0,730430*
Anchura de los macroconidios de 2 tabiques	-0,071949	0,877877*
Longitud de los macroconidios de 3 tabiques	-0,504006	0,654497*
Anchura de los macroconidios de 3 tabiques	-0,123738	0,837912*
Tamaño de las clamidosporas	0,435739	0,047171

* variables con mayor influencia dentro de los factores 1 y 2

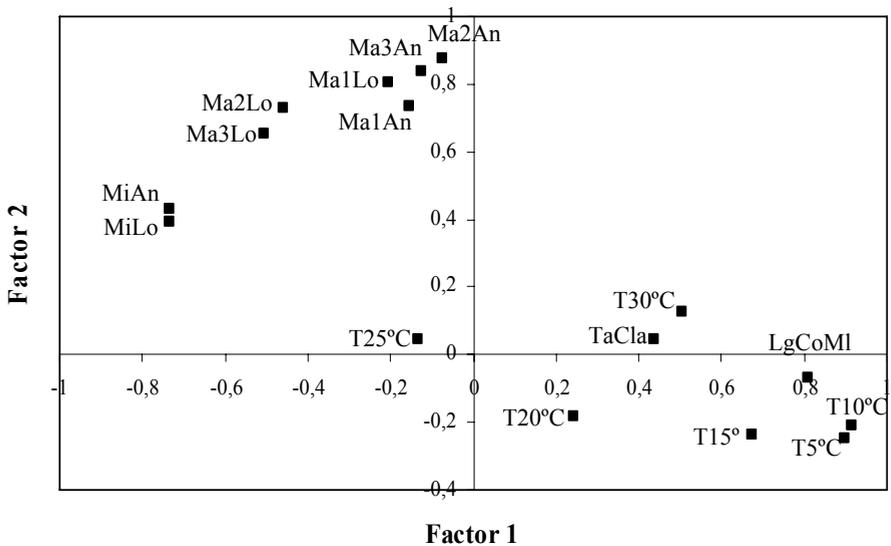


Figura 3.4. Proyección de las variables analizadas según los dos factores seleccionados en el análisis estadístico multivariante. **MiLo**: longitud de los microconidios, **MiAn**: anchura de los microconidios, **Ma1Lo**: longitud de los macroconidios de 1 tabique, **Ma1An**: anchura de los macroconidios de 1 tabique, **Ma2Lo**: longitud de los macroconidios de 2 tabiques, **Ma2An**: anchura de los macroconidios de 2 tabiques, **Ma3Lo**: longitud de los macroconidios de 3 tabiques; **Ma3An**: Anchura de los macroconidios de 3 tabiques, **T5°C**: crecimiento diario a 5 °C, **T10°C**: Crecimiento diario a 10 °C, **T15°C**: Crecimiento diario a 15 °C, **T20°C**: Crecimiento diario a 20 °C, **T25°C**: Crecimiento diario a 25 °C, **T30°C**: Crecimiento diario a 30 °C, **LgCoMI**: Log_{10} conidios mL^{-1} , **TaCla**: Tamaño de las clamidosporas

La proyección de los aislados sobre el plano de los dos factores seleccionados los separó en dos grupos claramente definidos (Figura 3.5). Uno de ellos quedó formado por 56 de los aislados españoles y el aislado de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609), mientras que en el otro quedaron agrupados los 26 aislados españoles restantes y los cuatro aislados de referencia de *C. lirioidendri* (CBS 117526, CBS 117640, Cy 13 Portugal y Cy 15 Portugal).

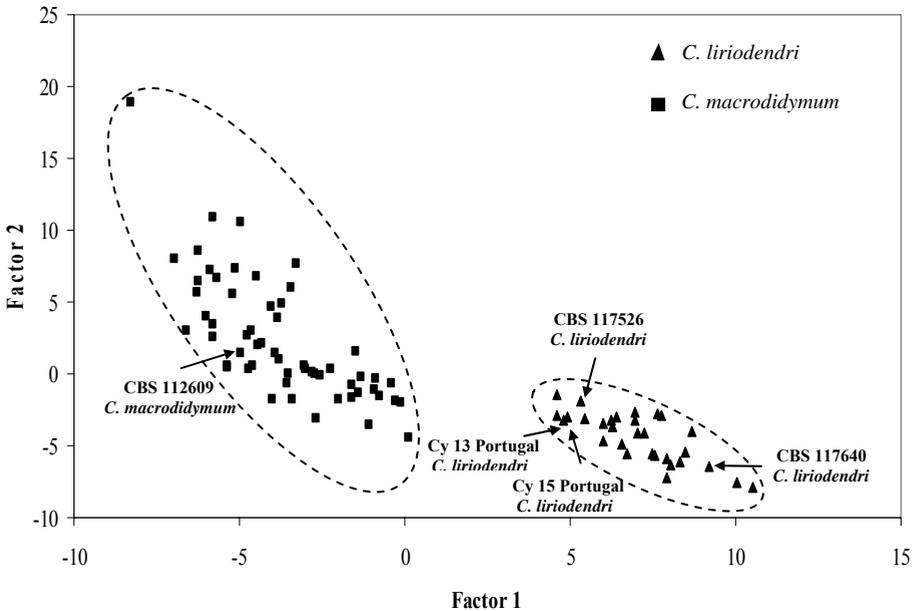


Figura 3.5. Proyección de los aislados de *Cylindrocarpon* spp. estudiados sobre el plano de los dos factores seleccionados en el análisis estadístico factorial multivariante.

Los valores medios de las variables fenotípicas con mayor influencia en los factores 1 y 2 utilizadas para caracterizar ambas especies entre los aislados españoles, están indicados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Valores medios y rango de las variables fenotípicas con mayor influencia en el análisis factorial multivariante utilizados para caracterizar los aislados españoles de *Cylindrocarpon*.

Variables fenotípicas	Especies ^y	
	<i>C. liriodendri</i>	<i>C. macrodidymum</i>
Log ₁₀ número de conidios mL ⁻¹	(5,3) 5,7 (6,4) ^z	(1,1) 3,5 (5,5)
Ratio de crecimiento diario (mm)		
5 °C	(0,19) 0,32 (0,46)	(0,01) 0,06 (0,12)
10 °C	(0,46) 0,72 (0,81)	(0,11) 0,28 (0,50)
Macroconidios (µm)		
un tabique		
longitud	(11,6) 16,1 (21,6)	(12,7) 18,6 (26,9)
anchura	(3,7) 4,4 (5,0)	(3,8) 4,6 (5,3)
dos tabiques		
longitud	(21,5) 23,4 (25,6)	(27,2) 30,5 (33,7)
anchura	(4,8) 5,0 (5,3)	(5,0) 5,4 (5,7)
tres tabiques		
longitud	(24,6) 27,5 (29,7)	(33,1) 35,9 (39,0)
anchura	(5,0) 5,3 (5,6)	(5,5) 5,8 (6,2)

^y las especies fueron identificadas mediante el estudio del gen de la β-tubulina, región ITS y de las variables fenotípicas

^z los datos expuestos representan las medias para cada variable con sus valores mínimos y máximos entre paréntesis

3.3.2- Análisis molecular

Los cebadores Dest1/Dest4, diseñados por Hamelin *et al.* (1996) para detectar *C. destructans* en las raíces y el cuello de plantas de semilleros de coníferas, amplificaron los 82 aislados de *Cylindrocarpon* spp. de vid evaluados y los cinco aislados de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609) y *C. liriodendri* (CBS 117526, CBS 117640, *Cy 13* Portugal y *Cy 15* Portugal) incluidos en este estudio. El producto obtenido se correspondió en todos los casos a un fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb, coincidiendo con lo obtenido por Nascimento *et al.* (2001) (Figura 3.6).

Mediante el análisis por PCR utilizando los cebadores BT1a/BT1b que amplifican la secuencia parcial BT1 del gen de la β-tubulina, se obtuvieron

productos de PCR de dos tamaños diferentes. En 56 de los aislados y el aislado de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609) el producto amplificado era un fragmento de ADN de aproximadamente 520 pb, mientras que en el resto (26 aislados) y los cuatro aislados de referencia de *C. lirioidendri* (CBS 117526, CBS 117640, Cy 13 Portugal y Cy 15 Portugal) el tamaño fue próximo a 470 pb (Figura 3.7).

En el alineamiento de estas secuencias efectuado con el programa CLUSTAL W, se observó en aquéllas de mayor tamaño una inserción de 52 pb ubicada en la misma posición en todos los casos. En el análisis de la traducción de estas secuencias, se encontró que esta inserción coincide con un intrón, mientras que el resto es codificante. Las otras secuencias, 26 en total, son codificantes en su totalidad.

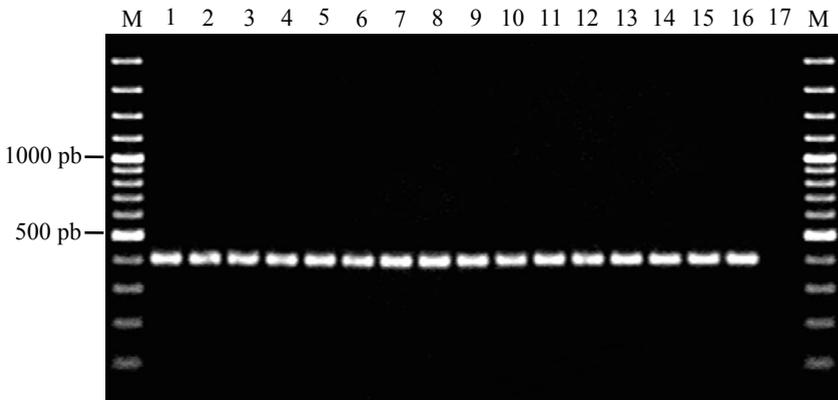


Figura 3.6. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores Dest1/Dest4; carriles M: marcador de peso molecular de 100 pb de diferencia; carriles 1 a 6: aislados de *C. lirioidendri* Cy 18, Cy 21, Cy 23, Cy 36, Cy 37, Cy 3; carriles 7 y 8: aislados de referencia de *C. lirioidendri* CBS 117640 y CBS 117526; carriles 9 a 15: aislados de *C. macrodidymum* Cy 1, Cy 2, Cy 3, Cy 9, Cy 12, Cy 14, Cy 15; carril 16: aislado de referencia de *C. macrodidymum* CBS 112609 y carril 17: control negativo.

En el estudio filogenético de estas mismas secuencias, correspondientes a la región BT1 del gen de la β -tubulina, se incluyeron 423 nucleótidos de los cuales 31 fueron variables. Con el método NJ se construyó un árbol filogenético en el que se identificaron dos clados consistentes (100 %) (Figura 3.8). Uno de ellos incluyó las secuencias de los 56 aislados que contenían la inserción de 52 pb, el aislado de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609), y las secuencias adicionales de *C. macrodidymum* (AY997608, AY997619 y AY997604) siendo todas ellas muy similares entre sí. Mientras que el otro grupo estuvo compuesto por las secuencias de los restantes 26 aislados españoles, los cuatro aislados de referencia de *C. liriodendri* (CBS 117526, CBS 117640, *Cy 13* Portugal y *Cy 15* Portugal), y las secuencias adicionales de *C. liriodendri* (AY997601, AY997602 y AY997587) siendo también éstas muy similares entre sí.

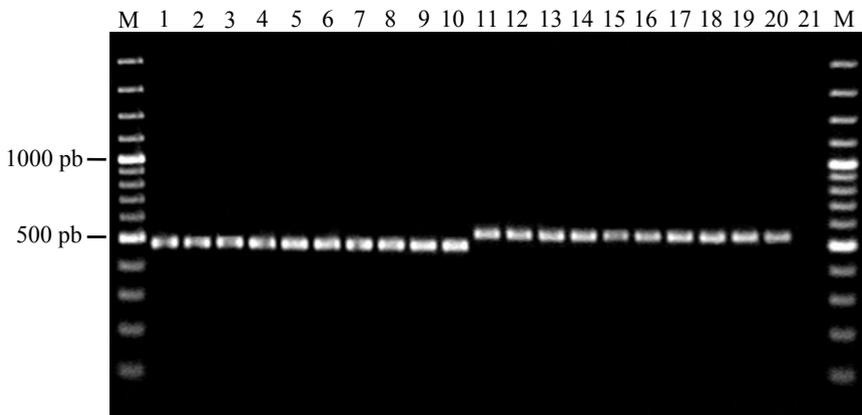


Figura 3.7. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores BT1a/BT1b; carriles M: marcador de peso molecular de 100 pb de diferencia; carriles 1 a 8: aislados de *C. liriodendri* *Cy 18*, *Cy 21*, *Cy 23*, *Cy 36*, *Cy 37*, *Cy 38*, *Cy 39*, *Cy 58*; carriles 9 y 10: aislados de referencia de *C. liriodendri* CBS 117640 y CBS 117526; carriles 11 a 19: aislados de *C. macrodidymum* *Cy 1*, *Cy 2*, *Cy 3*, *Cy 9*, *Cy 12*, *Cy 14*, *Cy 15*, *Cy 16*, *Cy 17*; carril 20: aislado de referencia de *C. macrodidymum* CBS 112609 y carril 21: control negativo.

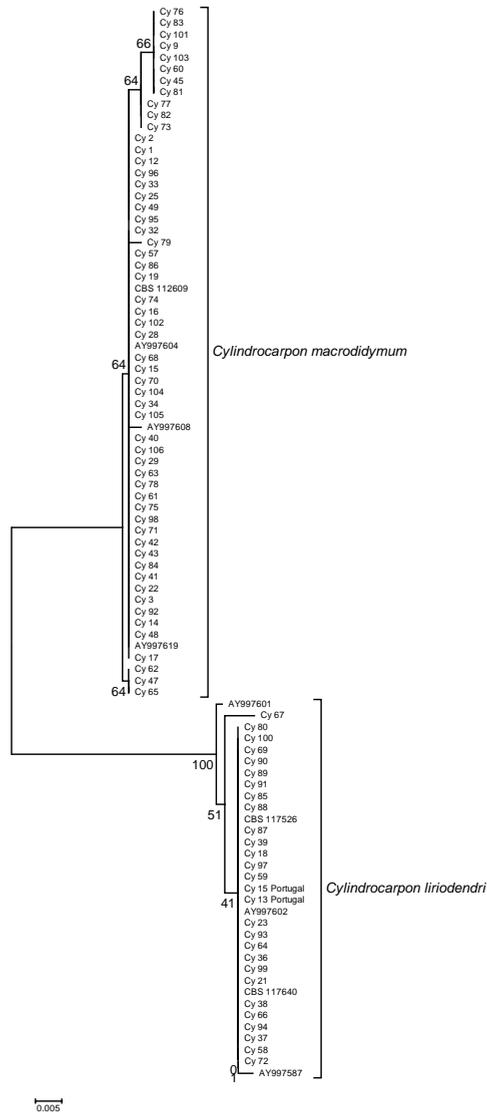


Figura 3.8. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la β -tubulina (BT1), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los aislados de *Cylindrocarpon* son los indicados en la Tabla 3.1, y las secuencias adicionales de *C. lirioidendri* de California (AY997601 y AY997602) y Francia (AY997587), y de *C. macrodidymum* de California (AY997608 y AY997619) y Chile (AY997604) obtenidas del GenBank. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis “bootstrap” de 1000 repeticiones.

Los productos de amplificación obtenidos con los cebadores universales ITS1/ITS4 alcanzaron un tamaño de aproximadamente 550 pb, siendo similar en los 37 aislados de la colección y en los aislados de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609) y de *C. lirioidendri* (CBS 117526, CBS 117640, Cy 13 Portugal y Cy 15 Portugal) incluidos en este estudio (Figura 3.9).

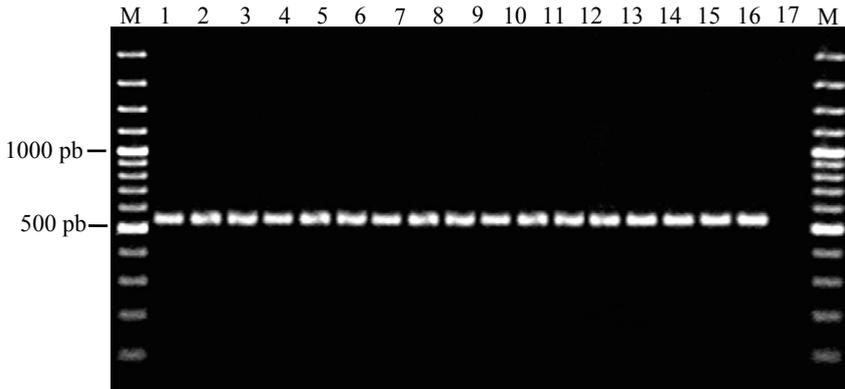


Figura 3.9. Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores universales ITS1/ITS2; carriles M: marcador de peso molecular de 100 pb de diferencia; carriles 1 a 6: aislados de *C. lirioidendri* Cy 18, Cy 21, Cy 23, Cy 36, Cy 37, Cy 38; carriles 7 y 8: aislados de referencia de *C. lirioidendri* CBS 117640 y CBS 117526; carriles 9 a 15: aislados de *C. macrodidymum* Cy 1, Cy 2, Cy 3, Cy 9, Cy 12, Cy 14, Cy 15; carril 16: aislado de referencia de *C. macrodidymum* CBS 112609 y carril 17: control negativo.

En el análisis filogenético de las secuencias de la región ITS de los 42 aislados seleccionados, se incluyeron 461 nucleótidos, y de éstos 40 fueron variables. Con el método NJ se construyó un árbol filogenético en el que se identificaron dos clados consistentes (100 %) (Figura 3.10). Uno de ellos estuvo compuesto por 31 aislados, el aislado de referencia de *C. macrodidymum* (CBS 112609), y las secuencias de *C. macrodidymum* AY677287, AY997550 y AY997556. Mientras que el otro grupo incluyó las secuencias de los restantes seis aislados, los cuatro aislados de referencia de *C. lirioidendri* (CBS 117526, CBS 117640, Cy 13 Portugal y Cy 15 Portugal), y las secuencias de *C. lirioidendri* AY667267, AY997533 y AY997547. Del mismo modo que en la

filogenia anterior, también aquí todas las secuencias dentro de cada clado fueron muy similares, con excepción del aislado Cy 67 incluido en el grupo de *C. liriodendri*.

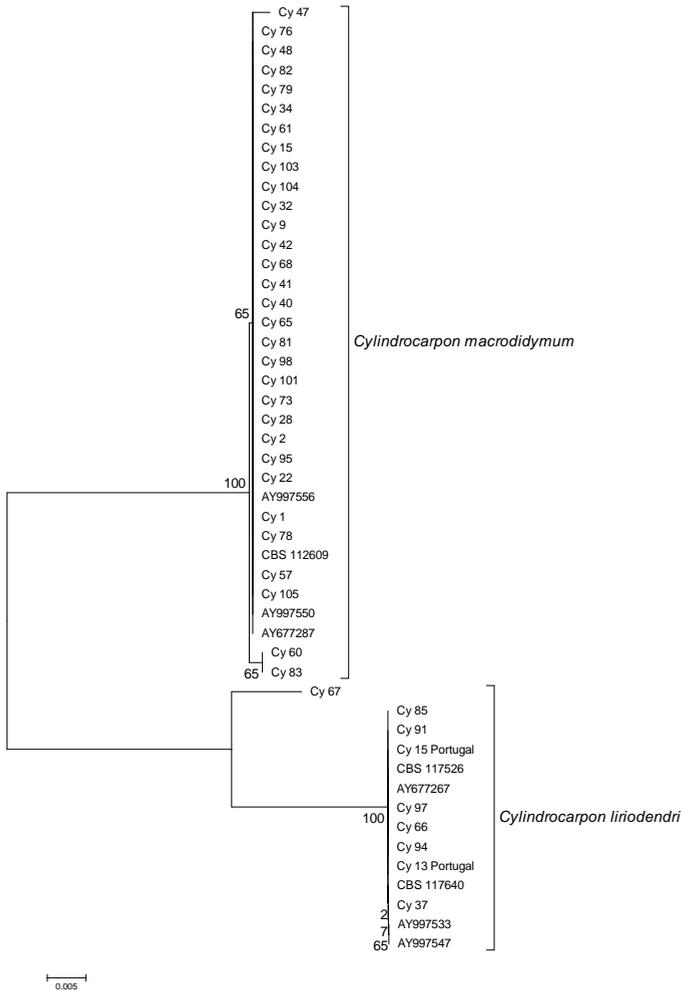


Figura 3.10. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los aislados de *Cyindrocarpon* son los indicados en la Tabla 3.1, y las secuencias adicionales de *C. liriodendri* de Sudáfrica (AY677267), Francia (AY997533) y California (AY997547) y de *C. macrodidymum* de Sudáfrica (AY677287), Chile (AY997550) y California AY997556 obtenidas del GenBank. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis “bootstrap” de 1000 repeticiones.

3.3.3- Patogenicidad

En el primer experimento, en el que se ensayaron suspensiones de conidios de diferentes concentraciones, la comparación de los resultados entre los dos ensayos efectuados no detectó diferencias estadísticas significativas; lo mismo ocurrió con la comparación entre sí de los tres aislados inoculados de cada especie de *Cylindrocarpon*. Por lo tanto, los datos de ambos ensayos y de los tres aislados de cada especie se analizaron conjuntamente. Los resultados de patogenicidad de este experimento tras cuatro meses desde la plantación, se muestran en las Tablas 3.7 y 3.8.

Tabla 3.7. Patogenicidad de la especie *C. liriodendri* (aislados Cy 59, Cy 64 y Cy 85 analizados conjuntamente) inoculada con diferentes concentraciones de conidios en el portainjertos de vid cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación.

Especie	Concentración de conidios	Índice daño raíz ^w	Peso seco raíz (g)	Peso seco aéreo (g)
<i>C. liriodendri</i>	1 x 10 ⁷	2,50 ^x d ^y	3,25 c ^z	8,21 b
	1 x 10 ⁶	2,26 d	3,26 c	9,10 ab
	1 x 10 ⁵	1,34 c	4,02 b	9,11 ab
	1 x 10 ⁴	0,83 b	4,13 ab	8,60 b
Control		0,00 a	4,92 a	10,25 a

^w El índice de daño en raíz fue evaluado siguiendo la siguiente escala: 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 10 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 10 a 25 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 25 a 50 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con mas de 50 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta.

^x Los valores representan las medias de los 48 datos de los tres aislados de *C. liriodendri*, Cy 59, Cy 64 y Cy 85, y los dos ensayos (en total 8 repeticiones por tres aislados y por dos ensayos).

^y GENMOD, la medias en la columna seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas de acuerdo al test χ^2 ($\alpha = 0,05$).

^z ANOVA, la medias en cada columna seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo al test diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0,05$).

Las plantas del portainjerto 110 R inoculadas con suspensiones de conidios de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* de diferentes concentraciones, manifestaron síntomas de pie negro. Éstos consistieron en una vegetación débil, hojas cloróticas y necróticas, y depresiones y necrosis en las raíces con escaso desarrollo de la masa radicular (Figura 3.11).

Los valores *P* indicaron un efecto significativo de la concentración de conidios inoculada para la variable índice de daño en raíz, siendo este valor similar ($P < 0,0001$) en ambas especies. Los resultados de esta variable se situaron entre 0,83 y 2,50 en la especie *C. liriodendri* y entre 1,03 y 1,74 en la especie *C. macrodidymum*, diferenciándose significativamente del tratamiento control.

Tabla 3.8. Patogenicidad de la especie *C. macrodidymum* (aislados Cy 1, Cy 14 y Cy 63 analizados conjuntamente) inoculada con diferentes concentraciones de conidios en portainjertos de vid del cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación.

Especie	Concentración de conidios	Índice daño raíz ^w	Peso seco raíz (g)	Peso seco aéreo (g)
<i>C. macrodidymum</i>	1 x 10 ⁶	1,74 ^x c ^y	3,37 c ^z	7,97 a
	1 x 10 ⁵	1,51 c	4,02 b	11,61 a
	1 x 10 ⁴	1,03 b	4,25 ab	9,11 a
Control		0,00 a	4,92 a	10,25 a

^w El índice de daño en raíz fue evaluado siguiendo la siguiente escala: 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 10 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 10 a 25 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 25 a 50 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con mas de 50 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta.

^x Los valores representan las medias de los 48 datos de los tres aislados de *C. macrodidymum* Cy 1, Cy 14 y Cy 63 y los dos ensayos (en total 8 repeticiones por tres aislados y por dos ensayos).

^y GENMOD, la medias en la columna seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas de acuerdo al test χ^2 ($\alpha = 0,05$).

^z ANOVA, la medias en cada columna seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo al test diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0,05$).

No ocurrió lo mismo con las otras dos variables. En el caso del peso seco de la raíz el valor de P también fue significativo con $P = 0,0001$ en *C. liriodendri* y $P = 0,0019$ en *C. macrodidymum*. Sin embargo, aunque los resultados mostraron un menor peso seco de la raíz cuanto mayor era la concentración de conidios inoculada, fue a partir de la concentración de 1×10^5 conidios mL^{-1} cuando se encuentran diferencias significativas comparado con el tratamiento control, siendo este resultado similar en ambas especies. En cuanto al peso seco de la parte aérea, los resultados fueron más erráticos. Se detectó un efecto significativo de esta variable en la especie *C. liriodendri* ($P = 0,0207$), pero no en *C. macrodidymum* ($P = 0,3287$). Asimismo, los datos no se ordenaron de forma decreciente cuanto mayor era la concentración de conidios inoculada.

En el segundo experimento, en el que se evaluó la patogenicidad de un número amplio de aislados, seis en cada especie, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los resultados de ambos ensayos efectuados y, por tanto, también aquí se analizaron los datos conjuntamente. En la Tabla 3.9 pueden observarse los resultados del estudio de patogenicidad tras cuatro meses desde la plantación.

Todos los aislados evaluados de ambas especies fueron patógenos al portainjerto de vid cultivar 110 R. Los valores de P indicaron un efecto significativo de los aislados en todas las variables: índice de daño en raíz ($P < 0,0001$), peso seco de raíz ($P = 0,0000$) y en peso seco de la parte aérea ($P = 0,0001$). El índice de daño de raíz de los aislados de ambas especies, se situó entre 1,75 y 2,50 diferenciándose significativamente del tratamiento control. En todos los aislados los valores de peso seco de raíz y peso seco de la parte aérea decrecieron significativamente respecto al tratamiento control, con excepción de los aislados Cy 88 y Cy 36 de *C. liriodendri* para la variable peso seco de la parte aérea. En éste último aislado, además el peso seco de la parte aérea fue superior al tratamiento control, aunque no se diferenció significativamente.

Los contrastes efectuados indicaron que *C. liriodendri* no se diferenció de *C. macrodidymum* en las variables índice de daño en raíz y peso seco de raíz, pero sí en la variable peso seco de la parte aérea ($P < 0,01$). En *C. liriodendri* el

peso seco de la parte aérea fue significativamente mayor que en *C. macrodidymum*.

Tabla 3.9. Patogenicidad de seis aislados de *C. liriodendri* y seis de *C. macrodidymum* inoculados en el portainjerto de vid cultivar 110 R, cuatro meses después de la plantación.

Aislado		Índice daño raíz ^v	Peso seco raíz (g)	Peso seco aéreo (g)
<i>C. liriodendri</i>	Cy 36	1,20 ^w bc ^x	4,09 b ^y	11,21 a
	Cy 59	2,15 def	3,35 bcd	9,20 bcd
	Cy 64	2,50 f	3,29 cd	9,30 bcd
	Cy 72	1,11 bc	3,87 bc	9,22 bcd
	Cy 85	2,27 ef	3,13 cd	8,73 bcde
	Cy 88	1,27 bc	4,09 b	9,85 abc
<i>C. macrodidymum</i>	Cy 1	1,50 cd	3,63 bcd	8,88 bcde
	Cy 14	2,00 def	3,23 cd	7,64 e
	Cy 32	0,93 b	3,91 bc	9,15 bcd
	Cy 63	1,64 cd	3,27 cd	7,48 e
	Cy 96	2,09 def	2,84 d	7,85 de
	Cy 104	1,75 cde	2,83 d	8,62 cde
Control		0,00 a	4,93 a	10,25 ab
Contrastes^z				
<i>C. liriodendri</i> vs.		1,75 vs.	3,66 vs.	9,67 vs.
<i>C. macrodidymum</i>		1,63 ns	3,31 ns	8,28 **

^v El índice de daño en raíz fue evaluado siguiendo la siguiente escala: 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 10 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 10 a 25 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 25 a 50 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con mas de 50 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta.

^w Los valores representan las medias entre las 16 repeticiones por aislado (ocho por ensayo).

^x GENMOD, la medias en la columna seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas de acuerdo al test χ^2 ($\alpha = 0,05$).

^y ANOVA, la medias en cada columna seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo al test diferencias minimas significativas (LSD) ($\alpha = 0,05$).

^z Los contrastes lineales de un grado de libertad fueron utilizados para comparar ambas especies: * ($\alpha = 0,05$), ** ($\alpha = 0,01$) y ns = no significativo ($\alpha = 0,05$) de acuerdo al test *t* de Student.

En ambos experimentos, los aislados de *Cylindrocarpon* inoculados fueron reaislados de las plantas afectadas en MEAS siguiendo la metodología descrita anteriormente, confirmándose de esta manera los postulados de Koch's.



Figura 3.11. Aspecto de las raíces de los barbados del cultivar 110 R inoculados con suspensiones de conidios de diferentes concentraciones del aislado Cy 59 de *C. liriodendri*, a) control sin inocular, b) 1×10^4 conidios mL^{-1} , c) 1×10^5 conidios mL^{-1} , d) 1×10^6 conidios mL^{-1} y e) 1×10^7 conidios mL^{-1} .

3.4- DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de caracterización de una colección de aislados de *Cylindrocarpon* obtenidos de plantas de vid en viveros y de viñedos jóvenes con síntomas de pie negro en España. A partir del análisis de las características fenotípicas y moleculares (región BT1 del gen de la β -tubulina y región ITS) se identificaron dos especies entre los aislados estudiados: *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Este resultado coincide con los obtenidos en otras regiones vitivinícolas del mundo, donde se han citado estas mismas especies como

causantes del pie negro de la vid (Halleen *et al.*, 2004 y 2006b; Petit y Gubler, 2005 y 2007).

Los cebadores Dest1/Dest4, fueron diseñados por Hamelin *et al.* (1996) para detectar exclusivamente aislados de *C. destructans* de las raíces y cuello de plantas de vivero de coníferas. Nascimento *et al.* (2001), demostraron que estos cebadores eran capaces de amplificar secuencias de aislados de otras dos especies de *Cylindrocarpon*: *C. lirioidendri* (previamente identificada como *C. destructans*) obtenida de vides en Portugal (Rego *et al.*, 2001) y *C. obtusisporum* aislada de vides en California. En nuestros estudios también encontramos que pueden amplificar inespecíficamente secuencias internas de la región ITS de las especies *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum*. Podemos concluir entonces, que estos cebadores no son útiles para reconocer específicamente a la especie *C. destructans*.

El análisis de la región BT1 del gen de la β -tubulina y de la región ITS, que fueron utilizados por otros investigadores para identificar las especies de *Cylindrocarpon* que afectan a la vid (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005), también permitieron identificar a *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum* en los aislados españoles estudiados. La existencia de una inserción de 52 pares de bases en la secuencia de la región BT1 del gen de la β -tubulina, se considera un marcador específico para *C. macrodidymum* (Petit y Gubler, 2005). En nuestro estudio, esta inserción se encontró en el aislado de referencia de esta especie y en 56 de nuestros aislados; mientras que no estuvo presente en los cuatro aislados de referencia de *C. lirioidendri* ni en el resto de los aislados, 26 en total, que fueron identificados como *C. lirioidendri*.

El análisis filogenético de las secuencias de la región BT1 del gen de la β -tubulina, agrupó a todos los aislados en dos clados consistentes que se correspondieron con las especies *C. macrodidymum* y *C. lirioidendri* respectivamente. Dentro de cada clado quedaron incluidos los aislados de referencia y las secuencias adicionales correspondientes a cada una de ellas. Además, encontramos que los aislados de *Cylindrocarpon* dentro de cada especie de diversos orígenes geográficos en España, y de otras regiones en el mundo

como Australia, California, Chile, Francia, y Portugal presentaron secuencias muy similares.

El otro estudio filogenético efectuado, que se basó en las secuencias de la región ITS del ADN ribosómico, igualmente permitió identificar claramente las dos especies. En este caso se trabajó con una selección de 37 aislados españoles que se agruparon en dos clados consistentes. Cada clado incluyó los aislados de referencia y las secuencias adicionales de *C. macrodidymum* y *C. liriodendri* respectivamente. Con excepción del aislado español Cy 67 de *C. liriodendri*, también aquí encontramos que los aislados de *Cylindrocarpon* de cada especie de diversos orígenes geográficos en España, y de otras regiones en el mundo como Australia, California, Chile, Portugal y Sudáfrica presentaban secuencias muy similares entre sí.

Coincidiendo con lo publicado por otros investigadores (Rego *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004 y Petit y Gubler, 2005), los resultados del estudio fenotípico de los aislados presentaron una gran variabilidad. La morfología de las colonias mostró diferentes coloraciones en el anverso y reverso, el margen de crecimiento y la textura fue variable, y la zonación sólo se observó en algunos de los aislados. A su vez, el tamaño de los microconidios y macroconidios fue heterogéneo y la capacidad de esporulación de los aislados fue sumamente variable. Sin embargo, no fue posible establecer una clara concordancia entre estos resultados y la descripción de las especies.

Halleen *et al.* (2004), utilizaron el tamaño de los macroconidios para separar *C. macrodidymum* de *C. liriodendri* asegurando que el primero produce macroconidios más largos y anchos que el segundo. Sin embargo, dentro de nuestra colección, esta característica no fue consistente puesto que algunos de los aislados que se identificaron como *C. macrodidymum*, presentaban tamaños de macroconidios menores que otros identificados como *C. liriodendri*. A su vez, Petit y Gubler (2005) observaron que *C. liriodendri* produce relativamente más clamidosporas que *C. macrodidymum*, aunque consideraron a esta característica inconsistente para ser utilizada en la identificación de ambas especies. Estos autores indicaron además, que sí es posible diferenciar *C. macrodidymum* de *C. liriodendri* basándose en el color del reverso de las colonias crecidas en

MEA 2 %. En este medio de cultivo los aislados de *C. liriodendri* manifestaron diferentes tonos de amarillo, mientras que los de *C. macrodidymum* naranja-oscuro o marrón. Sin embargo, aunque ambos tipos de colores fueron observados cuando nuestros aislados se hicieron crecer en MEA 2 %, no se correspondieron con las especies identificadas previamente. Ambos tipos de color fueron observados en aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* indistintamente.

En nuestro trabajo, la identificación fenotípica de ambas especies fue contundente al someter los datos a un análisis estadístico factorial multivariante. Los dos factores seleccionados de este análisis, explicaron aproximadamente el 60 % del total de la variabilidad. La proyección de los aislados de *Cylindrocarpon* sobre el plano de los dos factores, separó claramente la colección en dos grupos de 26 y 56 aislados que se correspondieron con las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* respectivamente, quedando incluidos dentro de cada grupo los aislados de referencia respectivos. La identificación de las especies lograda utilizando este análisis estadístico, coincidió exactamente con el resultado obtenido mediante el estudio de las secuencias de la región BT1 del gen de la β -tubulina y la región ITS del ADN ribosómico.

Las variables fenotípicas capacidad de esporulación de los aislados y el crecimiento diario a las temperaturas de 5 y 10 °C, fueron las que más aportaron a la separación de estos dos grupos, seguidos por el tamaño de los macroconidios de 1, 2 y 3 tabiques. En consecuencia, *C. liriodendri* puede diferenciarse de *C. macrodidymum* dentro de una colección de aislados por producir más conidios, crecer más rápido a las temperaturas de 5 y 10 °C y presentar macroconidios de menor longitud y anchura.

La reproducción sexual se obtuvo entre aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. En nuestros experimentos los teleomorfos *Neonectria liriodendri* (teleomorfo de *C. liriodendri*) y *N. macrodidyma* (teleomorfo de *C. macrodidymum*) se generaron en condiciones heterotálicas, coincidiendo con lo expuesto por Halleen *et al.* (2004 y 2006b). En ambas especies los peritecios eran de color rojo, con ascosporas viables en su interior, y se desarrollaron solos o agrupados en concordancia también con la descripción efectuada por estos investigadores.

Los ensayos de patogenicidad efectuados, demostraron que los aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* son capaces de inducir los síntomas típicos del pie negro en portainjertos del cultivar 110 R. En las plantas inoculadas se observó menor desarrollo en la parte aérea, hojas cloróticas y necróticas, y necrosis en las raíces con reducción de la masa radicular. Estos síntomas se tradujeron en una disminución en el peso seco de la raíz y, en algunos casos, en el peso seco de la parte aérea. Estos resultados coinciden con lo obtenido en trabajos anteriores realizados por Rego *et al.* (2001), Halleen *et al.* (2004) y Petit y Gubler (2005) y confirman que ambas especies son patógenas a vid.

En el primer experimento, todas las concentraciones de inóculo evaluadas causaron índices de daño en raíz que se diferenciaron significativamente del tratamiento control. Sin embargo, en el tratamiento que se aplicó la dosis más baja (10^4 conidios mL^{-1}) el peso seco de raíz fue significativamente igual al control. En cuanto al peso seco de la parte aérea, esta variable resultó poco concluyente. Para efectuar las inoculaciones en el segundo experimento, si bien la concentración de 10^5 conidios mL^{-1} demostró ser capaz de infectar a las plantas, se optó por utilizar la siguiente más elevada, 10^6 conidios mL^{-1} , para asegurar la infección y posterior manifestación de los síntomas. Por otra parte, esta concentración fue la utilizada por Halleen *et al.* (2004) y Petit y Gubler (2005) en sus ensayos de patogenicidad.

C. obtusisporium es una de las especies que tradicionalmente se asoció a la enfermedad del pie negro, sin embargo no fue encontrada entre los aislados españoles estudiados. Halleen *et al.* (2004), que tampoco la encontraron en sus prospecciones, discutieron la posibilidad de que los aislados identificados en trabajos anteriores como *C. obtusisporium* corresponderían en realidad a *C. macrodidymum*. Petit y Gubler (2005), también señalaron que los aislados de *C. obtusisporium* asociados al pie negro en California por Scheck *et al.* (1998a), podrían estar incorrectamente identificados.

Como conclusión, en este Capítulo se han identificado las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* afectando a plantas jóvenes de vid en España,

siendo la segunda de ellas la predominante abarcando dos tercios del total de la colección de aislados estudiada. A pesar de la predominancia de *C. macrodidymum* frente a *C. liriodendri* en nuestra colección de aislados, en general, ambas especies se encontraron presentes en las diferentes regiones estudiadas. *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* desarrollaron estructuras sexuales en condiciones heterotálicas y demostraron ser patógenas en el portinjerto cultivar 110 R. Finalmente, destacar que ésta es la primera cita de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* afectando a vid en España.

CAPÍTULO 4

VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE
VIRULENCIA EN *Cylindrocarpon*
liriodendri y *C. macrodidymum*

4- VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE VIRULENCIA EN *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*.

4.1- ANTECEDENTES

Numerosos aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* obtenidos de vid y procedentes de diferentes orígenes geográficos, han sido caracterizados mediante estudios fenotípicos, análisis filogenéticos y ensayos de patogenicidad (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005). Sin embargo, hasta la fecha, no existe información disponible acerca de la diversidad genética que pueda existir en estos dos patógenos, y su relación con otras características como la variabilidad en virulencia; entendiendo por virulencia la cantidad de enfermedad generada por un patógeno medida a través de los síntomas en el hospedante. El conocimiento de esta información puede contribuir a un manejo más eficiente del pie negro de la vid, por ejemplo en la selección de portainjertos resistentes.

La técnica de análisis “Inter-Simple Sequence Repeat” (ISSR), también llamada “Random Amplified Microsatellites” (RAMS) fue originalmente desarrollada por Zietkiewicz *et al.* (1994) para analizar diversidad genética en plantas y animales. Más tarde, esta técnica también demostró ser una herramienta poderosa para el análisis de la variabilidad genética en hongos (Hantula *et al.*, 1996). Existen muchos ejemplos de hongos que han sido caracterizados mediante la técnica ISSR como *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. (Hantula *et al.*, 1997), *Claviceps* spp. (Tooley *et al.*, 2000), *Botryosphaeria* spp. (Zhou *et al.*, 2001), *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (Mahuku *et al.*, 2002), *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian (Cohen *et al.*, 2003), *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. (Mishra *et al.*, 2003), *Rhizoctonia solani* Kühn (Elbakali *et al.*, 2003), *Gremmeniella* spp. y *Phomopsis* spp. (Borja *et al.*, 2006), entre otros.

Esta técnica combina la simplicidad de la técnica “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD), la confianza de bandas derivadas de un ADN conocido y heredable, y el potencial para diferenciar poblaciones o especies recientemente divergentes (Zhou *et al.*, 2001). Con el método de análisis ISSR, el

ADN entre dos microsatélites cercanos es amplificado en diferentes zonas a lo largo del genoma. De este modo, cada banda amplificada corresponde a una única secuencia de ADN delimitada por dos microsatélites invertidos, generándose patrones de bandas que pueden ser polimórficos entre diferentes individuos. Los cebadores utilizados están compuestos por secuencias de microsatélites que pueden presentar el extremo 5' degenerado.

Debido a la falta de información que existe sobre la variabilidad genética de las especies de *Cylindrocarpon* causantes del pie negro de la vid, y su relación con otras variables, se plantean en este Capítulo los siguientes objetivos: 1) ensayar la utilidad del método ISSR para estudiar la variabilidad genética en *Cylindrocarpon* spp. causantes del pie negro de vid; 2) analizar la variabilidad genética dentro de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*; y 3) estudiar la relación entre la diversidad genética y el perfil de virulencia de estas dos especies.

4.2- MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1- Aislados fúngicos

Para el desarrollo de los objetivos planteados en este Capítulo, se utilizaron los 26 aislados de *C. liriodendri* y los 56 de *C. macrodidymum* españoles que se describen en el Capítulo 3. También fueron incluidos los cuatro aislados de referencia de *C. liriodendri* de vid originarios de Portugal y el aislado de referencia de *C. macrodidymum* de vid originario de Australia (Tabla 3.1).

4.2.2- Estudio molecular con la técnica ISSR

Extracción de ADN y análisis ISSR

El ADN de los distintos aislados, fue el mismo que el empleado en los análisis moleculares del Capítulo anterior. Para realizar los ensayos de este

Capítulo, una muestra de cada extracción de ADN fue diluida con agua (Chromasolv[®] Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) de manera que su concentración final quedase entre 0,5 y 5 ng μL^{-1} . La cantidad de ADN se midió electroforéticamente.

Para efectuar el análisis ISSR se seleccionaron diez cebadores, los cuales fueron evaluados por su capacidad de producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles en aislados de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Entre los cebadores utilizados, cuatro correspondieron a dinucleótidos y seis a trinucleótidos con, o sin, el extremo 5' degenerado (Tabla 4.1).

Cada reacción de PCR contenía 1x de tampón, MgCl_2 2,5 mM, 100 μM de cada uno de los dNTPs, 0,4 μM de cada cebador, 0,5 U de ADN-polimerasa (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μl de la dilución efectuada con el DNA extraído. La reacción se ajustó con agua (Chromasolv[®] Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a un volumen final de 25 μl . Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador modelo Peltier Termal Cyclor-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). Los programas consistieron en un primer paso de 95 °C durante 5 minutos para la desnaturalización del ADN, seguido de 34 ciclos a 95 °C durante 1 minuto, 50 °C (AG)₇, 41 °C (CA)₇ y (CT)₇, 58 °C (GT)₇, 49 °C (ACA)₅, 64 °C (CCA)₅, 61 °C (CGA)₅, 46 °C (GAC)₅, 56 °C (GTG)₅ o 61 °C (TCG)₅ durante 1 minuto para el anillamiento y 72 °C durante 2 minutos para las extensiones. Las extensiones finales fueron efectuadas a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 1,5 %, preparado con tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH = 8,0). El marcador de peso molecular utilizado fue una mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (Gene Ruler[™] 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Alemania). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con bromuro de etidio a una concentración de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ de agua y se expusieron en un equipo de fotodocumentación de geles (Gelprinter plus, TDI, Madrid, España). Las reacciones de PCR con cada uno de

los cebadores fueron repetidas al menos tres veces y solamente se consideraron las bandas nítidas y reproducibles.

Análisis de resultados ISSR

Los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores ISSR fueron registrados visualmente como presencia (1) o ausencia (0) de banda, considerando similares aquellas del mismo tamaño. Los datos de ambas especies se agruparon en una única matriz y se analizaron conjuntamente. La similitud genética entre dos aislados se calculó con el coeficiente de Dice (Dice, 1945) utilizando el método “SimQual”. A partir de la matriz de similitud se construyeron dendrogramas con la ayuda del método “Unweighted Pair Grouping by Mathematical Averaging” (UPGMA) y utilizando los programas “SHAN” y “TREE”. El grado de ajuste entre la matriz cofenética y la matriz en que se basó el agrupamiento, se estimó con el test de Mantel (Mantel, 1967). Para realizar todos estos análisis se utilizó el programa NTSYS-pc versión 2,02 (Exeter Software, Setauket, NY). Finalmente, se calculó el índice de diversidad genética según Nei (Nei, 1973) en *C. liriodendri* y en *C. macrodidymum* con el programa POPGENE versión 1,32 (Yhe *et al.*, 1997).

4.2.3- Patogenicidad

Para efectuar el ensayo de patogenicidad, se seleccionaron aislados de ambas especies de *Cylindrocarpon* de los siete grupos (G1 a G7) definidos de acuerdo al análisis de agrupamiento de las bandas generados con los cuatro cebadores ISSR seleccionados (grupos ISSR) (Figura 4.3). En total se utilizaron 19 aislados, cinco de *C. liriodendri*: Cy 18, Cy 36, Cy 59 y Cy 97 pertenecientes al grupo ISSR 1 (G1) y Cy 67 (G2); y 14 de *C. macrodidymum*: Cy 28, Cy 41 y Cy 96 (G3), Cy 1, Cy 14, Cy 22 y Cy 70 (G4), Cy 106 (G5), Cy 76, Cy 81 y Cy 101 (G6), y Cy 60, Cy 62 y Cy 77 (G7) (Tabla 4.3).

Todos los aislados se hicieron crecer en medio PDA durante tres semanas a 25 °C en oscuridad. Para preparar el inóculo, a cada placa se le agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) y se raspó mecánicamente la superficie con una

espátula. La suspensión de conidios se filtró a través de una malla, y se ajustó con ADE a una concentración de $1,0 \times 10^6$ conidios mL^{-1} midiendo con un hematocitómetro.

Semillas obtenidas del cultivar Tempranillo se sembraron individualmente en recipientes de plástico de 220 cc. que contenían turba estéril. Cuando las plántulas presentaban de dos a tres hojas verdaderas, fueron utilizadas para el ensayo de patogenicidad. Por cada aislado de *Cylindrocarpon* se inocularon seis plántulas regando sus raíces con 20 mL de suspensión de conidios. Como control sin inocular se utilizaron seis plántulas regadas solo con ADE. Después de la inoculación, todas las plántulas se mantuvieron durante dos meses en un invernadero a una temperatura de 25 a 30 °C, y dispuestas según un diseño completamente al azar.

Las plántulas se observaron a intervalos de cinco días, registrando cada vez los síntomas desarrollados en la parte aérea. Para evaluar los síntomas se utilizó una escala de 0 a 5 donde 0 = no síntomas, 1 = 1 a 25 %, 2 = 26 a 50 %, 3 = 51 a 75 %, 4 = 76 a 100 % de hojas cloróticas y/o necróticas, y 5 = planta muerta. En cada plántula se estimó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad o “Area Under the Disease Progress Curve” (AUDPC) mediante el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990) que se expresó como porcentaje del área máxima para la duración del experimento. Al final del experimento, la escala de síntomas en la parte aérea se utilizó para obtener el índice de severidad foliar de la enfermedad (ISFE) de cada planta individual.

Una vez finalizado el experimento, se arrancaron todas las plantas y sus raíces se lavaron cuidadosamente. El índice de severidad en raíz de la enfermedad (ISRE) de cada planta individual se evaluó siguiendo una escala de síntomas de 0 a 5; donde 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 25 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 26 a 50 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 51 a 75 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con más del 75 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta. Asimismo, al final del experimento se midió también el peso seco de la raíz y de la parte aérea. Para aislar los hongos inoculados, a partir de las raíces y cuello de las plantas con

síntomas, se realizaron aislamientos en medio MEAS siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3. El experimento se repitió dos veces.

Análisis estadístico

Para analizar los datos del AUDPC, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz se realizaron análisis de la varianza (ANOVA). Previo al análisis, los datos de porcentaje de AUDPC fueron transformados en arcoseno $(Y/100)^{1/2}$ donde Y = área bajo la curva de progreso de la enfermedad expresado como porcentaje del área máxima para la duración del experimento. Los valores de las medias se separaron mediante el test de diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los datos de ISFE e ISRE se analizaron mediante el procedimiento GENMOD utilizando una distribución multinomial y el “cumulative logic” de la función “link”. En este caso los valores de las medias fueron separados mediante el test de χ^2 con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para contrastar el efecto de diferentes combinaciones de grupos ISSR, se utilizaron contrastes lineales de un grado de libertad (Mead *et al.*, 2003). Todos los análisis se ejecutaron en el programa SAS (SAS Institut Inc., Cary, NC, USA). Previamente, utilizando estos mismos métodos de análisis, se compararon estadísticamente los resultados de los dos experimentos para poder analizarlos conjuntamente en caso de no existir diferencias significativas.

4.3- RESULTADOS

4.3.1- Estudio molecular con la técnica ISSR

De los diez cebadores ISSR evaluados, sólo cuatro generaron patrones de bandas polimórficas y reproducibles en aislados de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* obtenidos de vid (Tabla 4.1). Los productos amplificados mediante PCR utilizando los cebadores (AG)₇ y (CA)₇ fueron buenos pero muchas de sus bandas eran muy similares dificultando una clara definición de los patrones de bandas; los de (ACA)₅ y (CT)₇ no generaron bandas o eran muy débiles; los de (GAC)₅ y (GTG)₅ presentaban mucho fondo; y los de (GT)₇,

(CCA)₅, (CGA)₅ y (TCG)₅ fueron buenos, con poco fondo y presentaban patrones de bandas polimórficos. Estos últimos cuatro cebadores, (GT)₇, (CCA)₅, (CGA)₅ y (TCG)₅, se seleccionaron para analizar la variabilidad genética en aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* (Tabla 4.2). La reproducibilidad de las bandas amplificadas con estos cuatro cebadores, se confirmó al menos tres veces.

Tabla 4.1. Total de cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) evaluados con su temperatura de anillamiento y características de las amplificaciones obtenidas mediante PCR. Los cebadores marcados con negrita corresponden a los seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

Cebadores ISSR	Temperatura anillamiento (°C)	Visibilidad de las bandas	Comentarios	Referencia bibliográfica
5'HBH(AG) ₇ A	50	buena	patrones de bandas de difícil definición	Mahuku <i>et al.</i> , 2002
5'DBDA(CA) ₇	41	buena	patrones de bandas de difícil definición	Mahuku <i>et al.</i> , 2002
5'DVD(CT) ₇ C	41	ninguna	---	Mahuku <i>et al.</i> , 2002
5'YHY(GT)₇G	58	buena	polimórfico	Hantula <i>et al.</i> , 1997
5'BDB(ACA) ₅	49	débil	---	Hantula <i>et al.</i> , 1996
5'DDB(CCA)₅	64	buena	polimórfico	Hantula <i>et al.</i> , 1997
5'DHB(CGA)₅	61	buena	polimórfico	Hantula <i>et al.</i> , 1996
5'(GAC) ₅	46	manchadas	---	Pina <i>et al.</i> , 2005
5'(GTG) ₅	56	manchadas	---	Pina <i>et al.</i> , 2005
5'DHB(TCG)₅	61	buena	polimórfico	Elbakali <i>et al.</i> , 2003

En *C. liriodendri*, los cuatro cebadores seleccionados produjeron 36 bandas reproducibles entre 280 y 2700 pb aproximadamente; 32 de ellas (89 %) resultaron polimórficas y generaron nueve patrones diferentes de bandas, dos con los cebadores (TCG)₅, (CCA)₅ y (GT)₇, y tres con (CGA)₅. En *C. macrodidymum*, los cuatro cebadores produjeron 26 bandas reproducibles con tamaños comprendidos entre 360 y 2700 pb; 20 de ellas (77 %) fueron polimórficas y generaron 19 patrones diferentes de bandas; dos con los cebadores (TCG)₅ y (CCA)₅, cuatro con (CGA)₅ y once con (GT)₇ (Tabla 4.2 y Figuras 4.1 y 4.2).

El test de Mantel mostró un ajuste muy bueno entre la matriz cofenética y la matriz en la que se basó el agrupamiento ($r = 0,99$). El análisis de agrupamiento de ambas especies, basado en el coeficiente de Dice, detectó diversidad genética dentro de *C. lirioidendri* y de *C. macrodidymum* (Figura 4.3). El dendrograma mostró 20 genotipos diferentes entre los 87 aislados analizados. Estos genotipos fueron agrupados arbitrariamente en siete grupos, llamados grupos ISSR, con una similitud entre los aislados dentro de cada grupo de, al menos, el 88 %. Dos de estos grupos correspondieron a la especie *C. lirioidendri* (G1 y G2) y los restantes cinco a la especie *C. macrodidymum* (G3 a G7).

Tabla 4.2. Cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum* y sus características principales.

Cebadores ISSR	<i>C. lirioidendri</i>				<i>C. macrodidymum</i>			
	BA ^a	BP ^b	P% ^c	PB ^d	BA	BP	P%	PB
5'DHB(TCG) ₅	6	5	83	2	2	1	50	2
5'DDB(CCA) ₅	9	9	100	2	3	1	33	2
5'DHB(CGA) ₅	12	11	92	3	8	6	75	4
5'YHY(GT) ₇ G	9	7	78	2	13	12	92	11
Total	36	32	89	9	26	20	77	19

^aBA: Números de bandas amplificadas, ^bBP: Número de bandas polimórficas, ^cP%: Porcentaje de polimorfismo, ^dPB: Número de patrones de bandas

Los dos grupos ISSR detectados en *C. lirioidendri* estaban compuestos uno por 25 aislados españoles y los cuatro aislados de referencia de esta especie (G1), y el otro sólo por el aislado Cy 67 (G2), con una similitud entre ambos del 21 %. Los cinco grupos ISSR identificados en *C. macrodidymum* contenían siete aislados (G3), 25 aislados y el aislado de referencia de esta especie (G4), un solo aislado Cy 106 (G5), cinco aislados (G6), y ocho aislados (G7) respectivamente, con una similitud entre todos estos grupos entre el 68 % y el 79 % (Figura 4.3).

La similitud entre los grupos ISSR de *C. liriodendri* y los de *C. macrodidymum* fue 7 %. Finalmente, el índice de diversidad genética estimada según Nei fue en *C. liriodendri* $H = 0,06$ y en *C. macrodidymum* $H = 0,16$.

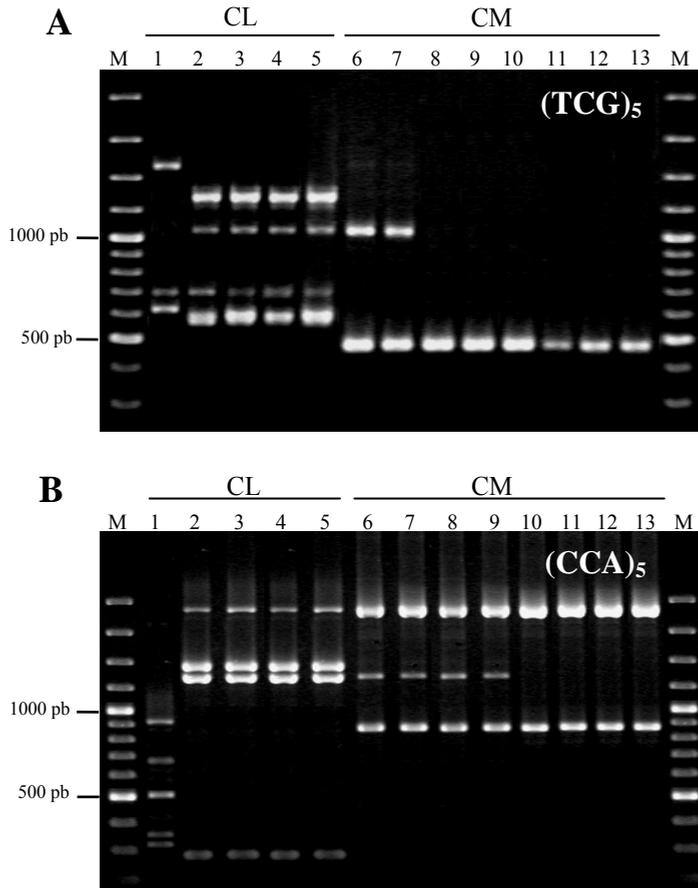


Figura 4.1. Patrones de bandas de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* obtenidos con los cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): **A)** cebador (TCG)₅ (carriles 1 a 13: Cy 67, Cy 18, Cy 36, Cy 59, Cy 97, Cy 28, Cy 96, Cy 1, Cy 22, Cy 60, Cy 77, Cy 81 y Cy 106), y **B)** cebador (CCA)₅ (carriles 1 a 13: Cy 67, Cy 18, Cy 36, Cy 59, Cy 97, Cy 22, Cy 28, Cy 41, Cy 70, Cy 60, Cy 76, Cy 77 y Cy 81). Carriles M: marcador de peso molecular de 100 pb de diferencia.

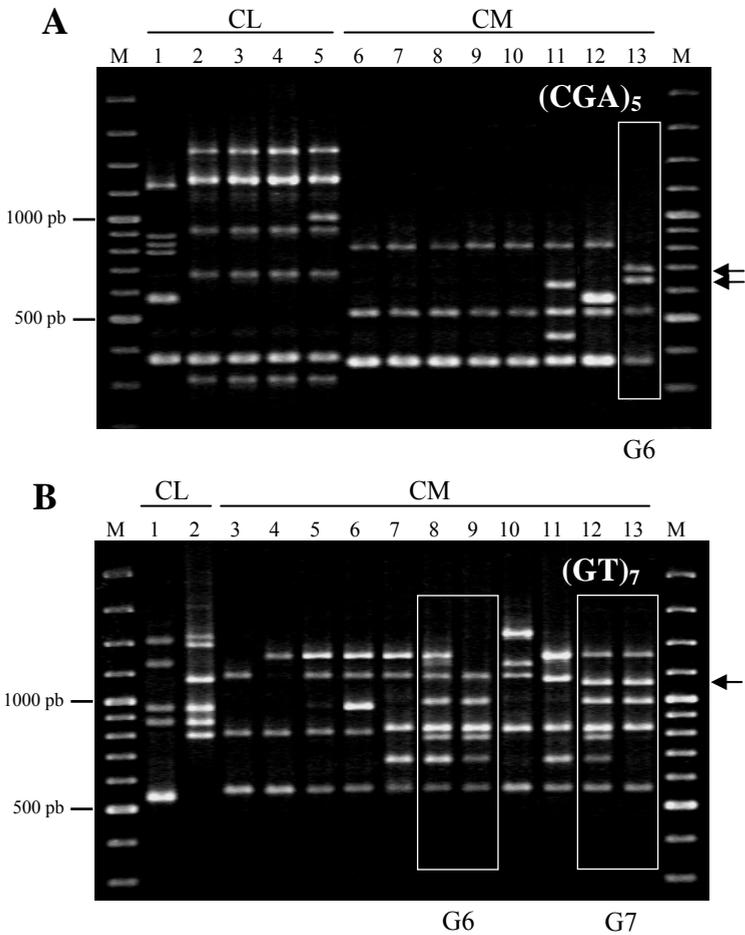


Figura 4.2. Patrones de bandas de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* obtenidos con los cebadores de Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): **A)** cebador (CGA)₅ (carriles 1 a 13: Cy 67, Cy 18, Cy 59, Cy 97, Cy 36, Cy 1, Cy 22, Cy 28, Cy 41, Cy 77, Cy 60, Cy 104 y Cy 81), y **B)** cebador (GT)₇ (carriles 1 a 13: Cy 67, Cy 18, Cy 79, Cy 70, Cy 1, Cy 14, Cy 28, Cy 81, Cy 65, Cy 106, Cy 25, Cy 77, y Cy 60). Carriles M: marcador de peso molecular de 100 pb de diferencia. Los recuadros y las flechas indican los patrones de bandas característicos y los marcadores moleculares de los aislados incluidos dentro de los grupos G6 y G7 de *C. macrodidymum*, definidos con el análisis de agrupamiento de las bandas generadas con el estudio ISSR.

Ninguno de los aislados de *C. liriodendri* o *C. macrodidymum* presentaron el mismo patrón de bandas. Dentro de *C. liriodendri*, los patrones de bandas producidos por el aislado Cy 67 con los cuatro cebadores utilizados, fueron diferentes a todos los obtenidos por el resto de aislados de esta especie. En *C. macrodidymum* los aislados dentro del grupo ISSR G6 presentaron patrones de bandas característicos con los cebadores (CGA)₅ y (GT)₇ y, además, generaron con el cebador (CGA)₅ dos bandas específicas del grupo (grupo ISSR, G6) de 640 y 680 bp aproximadamente (Figura 4.2 A carril 13 y Figura 4.2 B carriles 8 y 9). Del mismo modo, los aislados dentro del grupo ISSR G7 también mostraron patrones de bandas característicos, en este caso con el cebador (GT)₇, y también se amplificó con este cebador una banda específica del grupo (grupo ISSR, G7) de aproximadamente 1150 bp (Figura 4.2 B carriles 12 y 13).

4.3.2- Patogenicidad

Los resultados del ensayo de patogenicidad después de dos meses desde la inoculación se muestran en la Tabla 4.3. La comparación entre las dos repeticiones realizadas del experimento, no detectó diferencias estadísticas significativas, por lo que los datos obtenidos se analizaron conjuntamente. Todos los aislados de ambas especies de *Cylindrocarpon*, se comportaron como patógenos en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo. Los síntomas se desarrollaron aproximadamente a partir de diez días desde la inoculación y consistieron en reducción de vigor, presencia de hojas cloróticas y necróticas, raíces con lesiones necróticas y deprimidas, reducción de la masa radicular y, en ocasiones, la muerte de la planta (Figura 4.4).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas de virulencia entre los aislados para todas las variables evaluadas ($P < 0,0001$). El AUDPC alcanzó valores comprendidos entre 2,08 % y 44,51 % mientras que los índices ISFE e ISRE se ubicaron desde 0,50 a 3,25 y desde 0,50 a 3,58 respectivamente, con una completa gradación entre los aislados. Todos los aislados provocaron la disminución del peso seco de la parte aérea y de la raíz, con excepción del aislado Cy 97 cuyo peso seco de la parte aérea fue superior al tratamiento control, aunque no se diferenció significativamente de él.

Tabla 4.3. Virulencia de aislados españoles de *C. liriodendri* (CL) y *C. macrodidymum* (CM), seleccionados de los siete grupos ISSR definidos de acuerdo al análisis ISSR, a plántulas de vid obtenidas de semillas del cultivar Tempranillo dos meses después de la inoculación.

Grupos ISSR	Aislados	Parte aérea			Raíces		
		AUDPC ^{ab} (%)	ISFE ^c	Peso seco (g)	ISRE ^d	Peso seco (g)	
CL	G1	Cy18	5,56 ^e abc ¹	0,83 ab ⁵	0,92 abc ¹	1,17 bc	0,54 bcd
		Cy36	11,25 cdef	2,42 de	0,68 cdef	2,08 cd	0,34 efg
		Cy59	3,96 ab	0,58 ab	0,99 ab	0,92 b	0,57 abcd
		Cy97	5,14 abc	0,75 ab	1,08 a	0,67 b	0,55 bcd
CM	G2	Cy67	4,44 abc	1,25 bc	1,00 a	0,92 b	0,56 abcd
	G3	Cy28	2,42 ab	0,50 ab	0,89 abcd	0,50 b	0,64 abc
		Cy41	2,78 ab	0,67 ab	0,99 a	1,00 bc	0,55 bcd
		Cy96	10,14 bcde	1,08 bc	0,94 abc	1,25 bc	0,64 abc
G4		Cy1	2,08 ab	0,50 ab	1,05 a	0,50 b	0,59 abcd
		Cy14	5,07 abcd	1,00 bc	0,90 abcd	0,75 e	0,56 bcd
		Cy22	4,58 abc	1,08 bc	0,70 bcdef	1,83 cd	0,43 def
		Cy70	3,54 abc	0,75 ab	1,05 a	1,00 bc	0,69 ab
G5		Cy106	2,25 ab	0,70 ab	0,97 abc	0,60 b	0,67 abc
	G6	Cy76	20,42 f	2,25 cd	0,61 def	2,17 cd	0,30 fg
G7		Cy81	40,14 g	3,25 e	0,43 f	3,58 e	0,18 g
		Cy101	44,51 g	3,25 e	0,44 f	3,33 e	0,18 g
		Cy60	17,92 def	2,50 de	0,51 ef	2,67 de	0,35 efg
		Cy62	11,17 bcdef	1,20 bc	0,80 abcde	2,10 cd	0,51 cde
	Cy77	17,85 ef	2,67 de	0,45 f	3,00 de	0,31 fg	
	Control	0,00 a	0,25 a	1,06 a	0,00 a	0,73 a	

(continúa en la página siguiente)

Tabla 4.3. (Continúa de la página anterior)

Contrastes ^h (grupos ISSR)	Parte aérea			Raíces	
	AUDPC ^{a,b} (%)	ISFE ^c	Peso seco (g)	ISRE ^d	Peso seco (g)
(G1, G2) vs.					
(G3, G4, G5, G6, G7)	6,07 vs. 13,21 ns	1,17 vs. 1,53 ns	0,93 vs. 0,77 *	1,15 vs. 1,73 *	0,51 vs. 0,47 ns
G1 vs. G2	6,48 vs. 4,44 ns	1,15 vs. 1,25 ns	0,92 vs. 1,00 ns	1,21 vs. 0,92 ns	0,50 vs. 0,56 ns
(G3, G4, G5) vs. (G6, G7)	4,11 vs. 25,34 **	0,79 vs. 2,52 **	0,94 vs. 0,54 **	0,93 vs. 2,81 **	0,60 vs. 0,31 **
G3 vs. (G4, G5)	5,11 vs. 3,50 ns	0,75 vs. 0,81 ns	0,94 vs. 0,93 ns	0,92 vs. 0,94 ns	0,61 vs. 0,59 ns
G4 vs. G5	3,82 vs. 2,25 ns	0,83 vs. 0,70 ns	0,93 vs. 0,97 ns	1,02 vs. 0,60 ns	0,57 vs. 0,67 ns
G6 vs. G7	35,02 vs. 15,65 **	2,92 vs. 2,12 *	0,49 vs. 0,59 ns	3,03 vs. 2,59 ns	0,22 vs. 0,39 **
(G1, G2) vs. (G3, G4, G5)	6,07 vs. 4,10 ns	1,17 vs. 0,79 ns	0,93 vs. 0,94 ns	1,15 vs. 0,93 ns	0,51 vs. 0,60 ns

^a El "área under the disease progress curve" (AUDPC), calculada con el método de integración trapezoidal, se expresó como porcentaje del área máxima para la duración del experimento.

^b La comparación de las medias se efectuó con los valores transformados en arcoseno $(Y/100)^{1/2}$, sin embargo, las medias mostradas son sin transformar.

^c El índice de severidad foliar de la enfermedad (ISFE), fue evaluado con la siguiente escala: 0= no síntomas, 1= 1 a 25 %, 2= 26 a 50 %, 3= 51 a 75 %, 4= 76 a 100 % de hojas clorótica y necróticas, y 5= planta muerta.

^d El índice de severidad en raíz de la enfermedad (ISRE), fue evaluado con la siguiente escala: 0 = raíz sana sin lesiones, 1 = decoloración suave con 0 a 25 % de reducción en la masa radicular, 2 = decoloración suave con 26 a 50 % de reducción en la masa radicular, 3 = decoloración moderada con 51 a 75 % de reducción en la masa radicular, 4 = decoloración severa con más del 75 % de reducción en la masa radicular, y 5 = planta muerta.

^e Los valores representan la media de las 12 repeticiones para cada aislado, seis por ensayo.

^f ANOVA, la medias en cada columna seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo al test diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0,05$).

^g GENMOD, la medias en la columna seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas de acuerdo al test χ^2 ($\alpha = 0,05$).

^h Los contrastes lineales de un grado de libertad fueron utilizados para evaluar el efecto de diferentes combinaciones de grupos ISSR: * ($\alpha = 0,05$), ** ($\alpha = 0,01$) y ns = no significativo ($\alpha = 0,05$) de acuerdo al test *t* de Student.

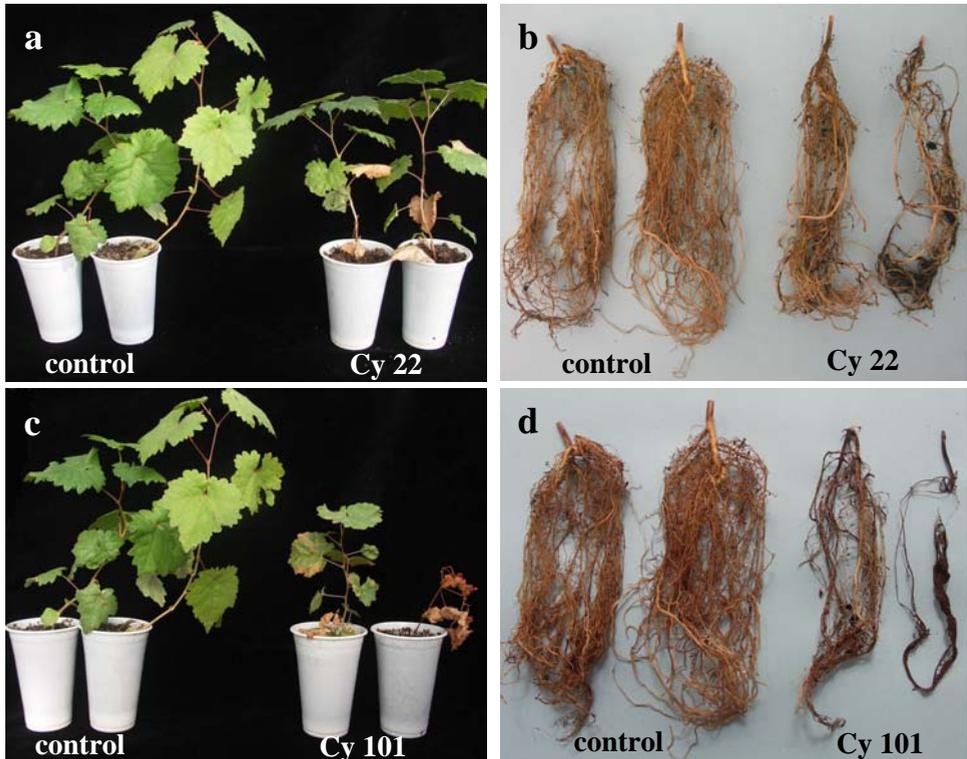


Figura 4.4. Síntomas desarrollados en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo dos meses después de inoculadas con *C. macrodidymum*; a) y b) plantas inoculadas con el aislado Cy 22 (grupo ISSR, G4); c) y d) plantas inoculadas con el aislado Cy 101 (grupo ISSR, G6).

Los contrastes efectuados indicaron que los aislados de *C. macrodidymum* (grupos ISSR G3 a G7) fueron significativamente más virulentos que los aislados de *C. liriodendri* (grupos ISSR G1 y G2) para las variables peso seco de la parte aérea ($P < 0,05$) e ISRE ($P < 0,05$). Dentro de *C. liriodendri*, los aislados del grupo ISSR G1 no se diferenciaron estadísticamente del aislado del grupo ISSR G2. Mientras que en *C. macrodidymum* los aislados incluidos dentro de los grupos ISSR G6 y G7 conjuntamente, resultaron significativamente más virulentos que los aislados incluidos dentro de los grupos ISSR G3, G4 y G5 agrupados para todas las variables estudiadas ($P < 0,01$). Los contrastes

efectuados entre aislados de los grupos ISSR G3, G4 y G5 no mostraron diferencias significativas en ninguna de las variables; mientras que los aislados del G6 fueron significativamente más virulentos que los aislados del G7 en las variables AUDPC ($P < 0,01$), ISFE ($P < 0,05$) y peso seco de raíz ($P < 0,01$). Finalmente, los contrastes entre los aislados de *C. liriodendri* (grupos ISSR G1 y G2) y los grupos ISSR G3, G4 y G5 de *C. macrodidymum* conjuntamente, no fueron significativamente diferentes.

4.4- DISCUSIÓN

Por primera vez se ha realizado un estudio sobre la diversidad genética y de virulencia en una amplia colección de aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, agentes causales del pie negro de la vid (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005). Mediante la técnica Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), se ha detectado variabilidad genética en aislados de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* de diferentes orígenes geográficos en España y de otros países como Portugal y Australia. Además, en los ensayos de patogenicidad efectuados con aislados seleccionados de los grupos ISSR de ambas especies, se ha demostrado que existen diferentes niveles de virulencia en *C. macrodidymum*.

Los cuatro cebadores, (GT)₇, (CCA)₅, (CGA)₅ y (TCG)₅, detectaron altos porcentajes de polimorfismo en *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. A su vez, el dendrograma obtenido con el análisis de agrupamiento de las bandas generadas con estos cuatro cebadores, fue robusto y estuvo de acuerdo con la identidad de los aislados de ambos patógenos.

Dentro de la especie *C. liriodendri* se definieron sólo dos grupos ISSR; uno de ellos compuesto por todos los aislados de esta especie (G1) con excepción del aislado Cy 67, que correspondió al otro grupo (G2). Asimismo, la similitud entre estos dos grupos fue muy baja. En los análisis filogenéticos efectuados con estos mismos aislados en el Capítulo 3, el aislado Cy 67 quedó incluido dentro del clado de *C. liriodendri* en la filogenia efectuada con las secuencias de la región BT1 del gen de la β -tubulina, pero un poco más separado en la filogenia efectuada con secuencias de la región ITS. En el presente estudio, donde se ha

realizado un análisis de “fingerprinting” del ADN, el aislado Cy 67 se separó claramente del resto de aislados de la especie *C. liriodendri*. Estos resultados indican que será necesario efectuar nuevas investigaciones para clarificar la identidad de este aislado, ya que es posible que se trate de una nueva especie.

Respecto a *C. macrodidymum*, en esta especie se definieron cinco grupos ISSR. Los análisis filogenéticos efectuados con estos mismos aislados en el Capítulo anterior, estimaron muy baja variabilidad entre las secuencias tanto de la región BT1 del gen de la β -tubulina como de la región ITS. Halleen *et al* (2004) y Petit y Gubler (2005) estudiaron el gen de la β -tubulina, la región ITS y la secuencia parcial del gen de la subunidad grande del ribosoma, alcanzando resultados similares a los nuestros con sus aislados de *C. macrodidymum* de vid obtenidos de diferentes países. Sin embargo, con el análisis ISSR efectuado en este Capítulo, se ha encontrado en esta especie una notable variabilidad genética entre los aislados. El valor estimado de diversidad genética según el coeficiente de Nei, estuvo muy por encima del estimado para la especie *C. liriodendri*, a pesar incluso de que en este último caso está incluido el aislado Cy 67.

Para efectuar los ensayos de patogenicidad en vid con especies de *Cylindrocapon*, normalmente se utilizan portainjertos enraizados de 6 a 12 meses de edad. Estos ensayos requieren al menos cuatro meses de incubación antes de poder ser evaluados y son de difícil manejo (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005). En los ensayos de patogenicidad que se describen en este Capítulo, se utilizaron plántulas en vez de portainjertos. Este material vegetal fue fácil de manipular y permitió comparar la virulencia de un elevado número de aislados de *Cylindrocarpon* spp. en un período de tiempo mucho más corto. Las plántulas utilizadas eran de variedad porque es muy difícil obtener semillas viables de portainjertos. Además, aunque el pie negro afecta principalmente a las raíces y a la madera del portainjerto, existen citas sobre la incidencia de *Cylindrocarpon* spp. en la zona del injerto, afectando tanto a patrón como a variedad (Halleen *et al.*, 2003; Aroca *et al.*, 2006; Giménez-Jaime *et al.*, 2006). Además, dos de los aislados de *C. macrodidymum* utilizados en esta Tesis se obtuvieron de la zona del injerto (Tabla 3.1).

Todos los aislados inoculados fueron capaces de producir los síntomas típicos del pie negro en las plántulas procedentes de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo. Esto confirma nuestros resultados del Capítulo anterior y lo publicado por otros investigadores en cuanto a la patogenicidad de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* a vid (Rego *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005). Por otra parte, los análisis de contrastes entre grupos ISSR indicaron diferencias significativas en virulencia entre los aislados de *C. macrodidymum*. De acuerdo con estos resultados los aislados inoculados correspondientes a los grupos ISSR G6 y G7 fueron más virulentos que el resto de aislados de *C. macrodidymum* o de *C. liriodendri*. En ensayos de patogenicidad con aislados de *C. macrodidymum* efectuados previamente por otros investigadores (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005), no se detectaron importantes diferencias en virulencia dentro de esta especie, probablemente por el bajo número de aislados incluidos en estos estudios. Mientras que, en el efectuado en el Capítulo 3 de esta Tesis, no quedó incluido ninguno de los aislados correspondientes a los grupos ISSR G6 o G7.

Estos resultados indican la necesidad efectuar nuevos ensayos de patogenicidad con aislados adicionales de *C. macrodidymum* para clarificar si cualquier aislado de *C. macrodidymum* que pudiese incluirse en los grupos ISSR G6 o G7, será también significativamente más virulento que otros aislados de *C. macrodidymum* o de *C. liriodendri*. La identificación de los aislados correspondientes a estos dos grupos ISSR, podría ser efectuada con los patrones de bandas característicos producidos por los cebadores ISSR (CGA)₅ y (GT)₇.

En resumen, en este Capítulo se ha demostrado que la técnica ISSR es una herramienta útil para analizar diversidad genética en aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* obtenidos de vid. Esta técnica separó claramente los aislados de estas dos especies y detectó diversidad genética en ambas, siendo mucho mayor en *C. macrodidymum*. Asimismo, los ensayos de patogenicidad efectuados demostraron que *C. macrodidymum* también presenta variabilidad en virulencia. La variabilidad genética y de virulencia encontrada en este estudio, puede ser significativa para el manejo de esta enfermedad.

CAPÍTULO 5

**DETECCIÓN DE MICOVIRUS EN
AISLADOS DE *Cylindrocarpon liriodendri*
y *C. macrodidymum***

5- DETECCIÓN DE MICOVIRUS EN AISLADOS DE *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*.

5.1- ANTECEDENTES

La presencia de micovirus en hongos patógenos de plantas, es un fenómeno bastante generalizado en la naturaleza. Existen muchos ejemplos de hongos infectados con micovirus, como es el caso de *Rhizoctonia solani* Kühn (Casthano *et al.*, 1978), *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (Anagnostakis y Day, 1979), *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Newhouse *et al.*, 1992), *Chalara elegans* Nag Raj & W.B Kendr. (Bottacin y Punja, 1994), *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Vilches y Castillo, 1997), *Fusarium graminearum* Schwabe (Chu *et al.*, 2002), *Heterobasidion annosum* (Fr.:Fr.) Bref. (Ihrmark *et al.*, 2004), o *Monilinia fruticola* (G. Wint.) Honey (Tsai *et al.*, 2004), entre otros.

La mayoría de los micovirus caracterizados están compuestos por moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) encapsuladas en partículas isométricas, o como elementos no encapsulados y asociados a las vesículas membranosas del citoplasma, o en las fracciones mitocondriales (Nuss y Koltin, 1990; Chu *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004). Los micovirus se transmiten mediante el contacto entre hifas o anastomosis, o a través de las esporas asexuales (Ghabrial, 1998; Romo *et al.*, 2007). En los ascomicetos, las esporas sexuales suelen estar libres de micovirus, mientras que entre los basidiomicetos existen varios ejemplos de especies cuyas basidiosporas pueden infectarse, como sucede en *Rhizoctonia solani* (Casthano y Butler, 1978; Casthano *et al.*, 1978).

En general, los micovirus no causan ningún cambio distinguible en los hongos que están infectando. Sin embargo, algunos de ellos provocan considerables variaciones morfológicas y fisiológicas tales como cambios en la morfología y ratio de crecimiento de las colonias, variaciones en la cantidad de esporulación, producción de toxinas, pigmentación o disminución de la virulencia entre otros (Anagnostakis y Day, 1979; Casthano y Butler, 1978; Nuss y Koltin, 1990; Bottacin y Punja, 1994; Ghabrial, 1998). Algunos micovirus, además de afectar al hongo también pueden alterar a su hospedante. Márquez *et*

al. (2007) encontraron que el micovirus que infecta al hongo *Curvularia protuberata* R.R. Nelson & Hodges le confiere a éste y a su hospedante, *Dichanthelium lanuginosum*, tolerancia para crecer en suelos con temperaturas elevadas.

Conocer las variaciones que causan algunos micovirus en los hongos, permite comprender mejor su comportamiento y, en algunas ocasiones, utilizarlas en nuestro beneficio. Un ejemplo de ello es el caso de *Cryphonectria parasitica*, hongo responsable del chancro del castaño. La hipovirulencia que le confieren los hipovirus que infectan a algunos aislados, ha sido utilizada como medida de control de la enfermedad (Heiniger y Rigling, 1994).

La presencia de micovirus en el género *Cylindrocarpon* fue descrita recientemente por Ahn y Lee (2001). Estos investigadores encontraron micovirus en aislados de *C. destructans*, el hongo causante de la podredumbre de raíz en ginseng. Se trata de ARNdc de 6,0, 5,0, 2,5 y 1,5 Kpb. Los estudios efectuados con estos micovirus demostraron que el de 6,0 Kpb podría estar relacionado con incrementos en la virulencia, esporulación y pigmentación de este hongo. Los aislados a los que se les eliminó este micovirus sufrieron importantes cambios fenotípicos y perdieron notoriamente su virulencia. Del mismo modo, la reinfección con este micovirus en los mismos aislados tuvo como consecuencia la restauración de dichas características.

Recientemente, Nascimento *et al.* (2007) detectaron la presencia de micovirus en aislados de *C. liriodendri* obtenidos de vid en Portugal. De los 61 aislados analizados, el 27 % estaban infectados. Los micovirus encontrados presentaban ARNdc de tres tamaños diferentes 15,0, 2,0 y 1,5 Kpb. La banda de mayor tamaño estaba presente en todos los aislados infectados, mientras que las otras dos sólo en algunos de ellos.

En España, no existen conocimientos acerca de la posible infección con micovirus de las dos especies de *Cylindrocarpon* causantes del pie negro de la vid, y de cómo podrían influenciar en el comportamiento de estos patógenos. Por tal motivo, el objetivo en este Capítulo es estudiar la posible presencia de micovirus en aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* de vid.

5.2- MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1- Aislados fúngicos

En este estudio la detección de micovirus fue efectuada en los 26 aislados de *C. liriiodendri* y los 56 de *C. macrodidymum* que se indican en el Capítulo 3 (Tabla 3.1). Como controles positivos se utilizaron el aislado de referencia de *C. liriiodendri* Cy 15 originario de Portugal (Tabla 3.1), que presenta un ARNdc de 15,0 Kpb (Nascimento *et al.*, 2007); un aislado de *Epichloë festucae* infectado por el micovirus EfV1, que posee un genoma de ARNdc de 5,1 Kpb (Romo *et al.*, 2007) y el aislado Mc0104 de *Monosporascus cannonballus* perteneciente a la colección de hongos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia, que contiene dos fragmentos de ARNdc con tamaños en torno a 4,0 y 3,0 Kpb.

Cada uno de los aislados, incluidos los controles positivos, se sembraron en cuatro placas con medio PDA que contenían en la superficie papel de celofán transparente estéril. Las placas se mantuvieron en estufa a 25 °C en oscuridad durante siete días, con excepción del aislado de *E. festucae* que por su lento crecimiento se mantuvo durante dos semanas. El micelio y las esporas crecidas sobre el papel celofán se retiraron cuidadosamente y se almacenaron a -20 °C.

5.2.2- Protocolo de extracción de ARNdc

El protocolo utilizado para la extracción de ARNdc se basa en cromatografía en celulosa según el método descrito por Valverde *et al.* (1990), y fue ajustado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Salamanca.

Reactivos y soluciones stock utilizados

Reactivos: **fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)**: Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S.A; **SDS** (dodecil sulfato de sodio): Merck-Schuchardt,

Hohenbrunn, Alemania; **β -mercaptoetanol**: Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania; **Tris base**: Roche, Barcelona, España; **NaCl**: Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S.A.; **EDTA** (ácido etilendiaminotetraacético sal disódica): Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S.A. **Ácido bórico**: Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S.A.

Soluciones stock: **STE 10X**: Tris HCl 0,1 M (pH 8,0) - NaCl 1 M - EDTA 5mM (pH 8,0); **SDS 10**: solución acuosa al 10 %; **STE 15**: STE 1X con 15% etanol; **TE**: Tris HCl 10 mM (pH 8,0) - EDTA 1,0 mM (pH 8,0). **TBE 1X**: tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH = 8,0.

Protocolo de extracción

- 1- Utilizar la muestra almacenada que fue obtenida del crecimiento del hongo en las cuatro placas con medio PDA (peso fresco de 3 a 6 g).
- 2- Pulverizar la muestra en un mortero con nitrógeno líquido.
- 3- Inmediatamente añadir al mortero:
 - 4 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 6,7 \pm 0,2).
 - 4 mL de tampón de extracción (STE 2X - SDS 0,5 % - β -mercaptoetanol 0,1 %).
 - 0,1 mL de solución acuosa de bentonita al 6 %.
- 4- Esperar a que se descongele la suspensión y mezclarla bien.
- 5- Verter la suspensión en un tubo de 12 mL de capacidad, enjuagar el mortero con 2 mL del tampón de extracción que también se añaden al tubo; mantener los tubos en hielo.
- 6- Equilibrar los tubos de dos en dos y centrifugar a 7000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- 7- Pasar la fase acuosa superior otro tubo de 12 mL; mantener los tubos en hielo.
- 8- Agregar 1,5 mL de etanol absoluto y enrasar a 10 mL con tampón de extracción (la solución debe quedar ajustada a un 15% de etanol); mantener los tubos en hielo.
- 9- Añadir a cada tubo 0,2 g de celulosa (Whatman CF-11) y agitar durante 2 minutos vigorosamente con ayuda de un vórtex; mantener los tubos en hielo.
- 10- Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a 4°C.

- 11- Desechar el sobrenadante del tubo centrifugado y disolver la pastilla de celulosa agregando 5 mL de STE 15.
- 12- Preparar otro tubo de 12 mL introduciéndole una jeringa de 2 mL sin el émbolo, y dentro un pequeño trozo de algodón estéril empujándolo bien hacia abajo; verter en la jeringa la pastilla de celulosa disuelta.
- 13- Centrifugar a 3000 rpm durante 3 min a 4°C y desechar el líquido eluido.
- 14- Para lavar los restos de ADN de la celulosa agregar a la jeringa 2 mL de STE 15 y centrifugar como en el paso 13, desechar el líquido eluido.
- 15- Repetir el lavado otras 4 veces, la última vez sólo agregando 1 mL de STE 15.
- 16- Pasar la jeringa a otro tubo de 12 ml y agregar 0,4 mL de STE 1X.
- 17- Centrifugar a 3000 rpm durante 3 min a 4 °C.
- 18- Pasar los 0,4 mL de STE 1X a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y añadir 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 mL).
- 19- Mantener a -20 °C al menos 1 hora.
- 20- Centrifugar a 13000 rpm durante 20 min a 4 °C.
- 21- Decantar el etanol rápidamente y marcar en el tubo Eppendorf dónde está situada la pastilla.
- 22- Dejar secar al aire el Eppendorf para eliminar los restos de etanol (se puede utilizar una estufa a 40 °C).
- 23- Disolver la pastilla en 10 µL de TE.
- 24- Añadir 2 µL de tampón de carga (Fermentas, Alemania) y cargar toda la muestra en un gel de agarosa (agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 0,7 % con TBE 0,5X. Marcadores de peso molecular utilizados: Lambda Mix Marker 19 con bandas de ADN desde 8,3 a 48,5 Kpb (Fermentas, Alemania) y una escalera de bandas de ADN desde 0,5 a 10,0 Kpb (Dominion MBL, Córdoba, España).

Entre los aislados en los que se detectó una banda que podría tratarse de un ARNdc se seleccionaron 20, incluidos los tres controles positivos, para analizarlos nuevamente y confirmar la composición de esta banda. Estos 20 aislados se sometieron a una segunda extracción efectuando, en este caso, dos lavados más con STE 15 que lo indicado en el protocolo. El producto obtenido se

analizó en gel de agarosa al 0,7 % con las mismas condiciones descritas anteriormente.

Estos mismos aislados fueron expuestos a una tercera extracción y, al contrario que en el caso anterior, se efectuaron dos lavados menos con STE 15 que lo indicado en el protocolo, y el producto obtenido digerido con DNAsa. Para la digestión, las pastillas de dos extracciones del mismo aislado se resuspendieron con agua (Chromasolv Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y se mezclaron como una única muestra. Una mitad se utilizó para la digestión y la otra como control sin digerir. Para la digestión se agregó a la alícuota correspondiente 1 μL de una dilución 1/50 de DNAsa libre de RNAsa concentración 114 u μL^{-1} (Invitrogen, U.S.A.), y se ajustó a un volumen final de 20 μL con agua. Esta alícuota se incubó a 25 °C durante 30 minutos. La alícuota digerida y la control se analizaron en gel de agarosa al 0,7 % con las mismas condiciones descritas anteriormente.

5.3- RESULTADOS

En ninguno de los 26 aislados de *C. lirioidendri* y 56 de *C. macrodidymum* españoles analizados se detectó presencia de ARNdc. Asimismo, en los controles positivos de *E. festucae* y *M. cannonballus*, en todas las extracciones efectuadas se extrajeron los ARNdc que estaban descritos para estos aislados (Figura 5.1). Sin embargo, no fue posible detectar el ARNdc de 15,0 Kpb en el control positivo de *C. lirioidendri* de Portugal (aislado Cy 15).

En la primera extracción el 51 % de los 82 aislados españoles evaluados, incluidos de *C. lirioidendri* (Cy 18, Cy 36, Cy 37, Cy 38, Cy 39, Cy 58, Cy 59, Cy 67, Cy 69, Cy 72, Cy 87, Cy 89, Cy 90, Cy 93, Cy 94, Cy 97 y Cy 100) y *C. macrodidymum* (Cy 1, Cy 2, Cy 9, Cy 14, Cy 15, Cy 16, 17, Cy 19, Cy 28, Cy 40, Cy 41, Cy 42, Cy 45, Cy 47, Cy 48, y 49, Cy 57, Cy 63, Cy 65, Cy 78, Cy 79, Cy 83, Cy 101, Cy 103, Cy 104) y el control positivo de *C. lirioidendri* de Portugal (Cy 15) , presentaron una banda muy tenue con un tamaño en torno a los 15,0 a 18,0 Kpb.

En la segunda extracción efectuada con los 20 aislados seleccionados (Cy 18, Cy 36, Cy 37, Cy 38, Cy 58, Cy 67, Cy 87, Cy1, Cy 2, Cy 14, Cy 16, Cy 17, Cy 28, Cy 40, Cy 47, Cy 48, Cy 63, *C. liriodendri* Cy 15, *E. festucae* y *M. cannonballus*), esta banda desapareció en todos ellos y en el control positivo de *C. liriodendri*; sin embargo, las bandas correspondientes a los ARNdc descritos en *E. festucae* y *M. cannonballus* permanecieron intactas.

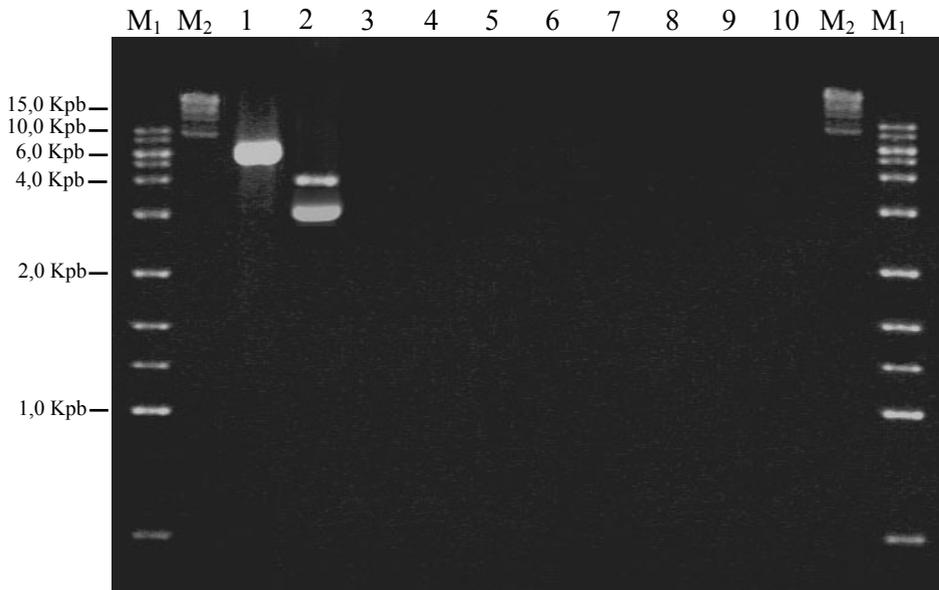


Figura 5.1. Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc; carriles M₁: marcador de peso molecular desde 0,5 a 10,0 Kpb; carriles M₂: marcador de peso molecular desde 8,3 a 48,5 Kpb; carril 1: control positivo de *E. festucae* infectado por EfV1; carril 2: control positivo de *M. cannonballus*; carriles 3 a 6: aislados de *C. liriodendri* Cy 21, Cy 23, Cy 64 y Cy 80; carriles 7 a 10: aislados de *C. macrodidymum* Cy 3, Cy 22, Cy 25 y Cy 29.

En la tercera extracción efectuada con estos mismos aislados, la banda en torno a 15 a 18 Kpb fue completamente digerida por la enzima DNAsa tanto en los aislados españoles como en el control positivo de *C. liriodendri* (Cy15). Asimismo, tanto en el control positivo de *E. festucae* como en el de *M.*

cannonballus el producto extraído permaneció inalterado durante la digestión (Figura 5.2).

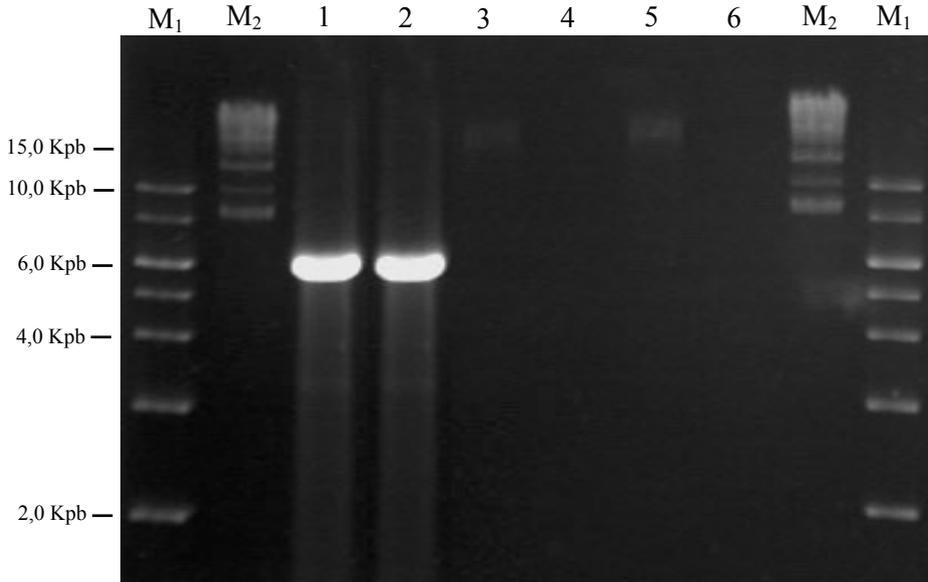


Figura 5.2. Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc antes y después de la digestión con la enzima DNAsa; carriles M₁: marcador de peso molecular desde 0,5 a 10,0 Kpb; carriles M₂: marcador de peso molecular desde 8,3 a 48,5 Kpb; carril 1: control positivo de ARNdc de EfV1 extraído de *E. festucae* sin digerir; carril 2: control positivo de ARNdc de EfV1 digerido; carril 3: control positivo de *C. liriodendri* Cy15 sin digerir; carril 4: control positivo de *C. liriodendri* Cy15 digerido; carril 5: aislado de *C. liriodendri* Cy 38 sin digerir; carril 6: aislado de *C. liriodendri* Cy 38 digerido.

5.4- DISCUSIÓN

En este trabajo se efectuó por primera vez un estudio relacionado con la detección de la infección por micovirus en aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* de vid. Si bien existen antecedentes de que aislados de la especie *C. liriodendri* pueden contener ARNdc (Nascimento *et al.*, 2007), con el

protocolo de extracción utilizado, en ninguno de los aislados españoles de esta especie ni en los de *C. macrodidymum* fue posible detectar presencia de micovirus.

Del mismo modo, en el control positivo de *C. lirioidendri* (aislado *Cy 15*), originario de la colección de aislados de vid de Portugal, tampoco fue posible obtener el ARNdc de 15,0 Kpb caracterizado por Nascimento *et al.* (2007). Sin embargo, con el mismo protocolo de extracción, sí se extrajeron consistentemente los ARNdc descritos en los controles positivos de *E. festucae* y *M. cannonballus*.

La banda con un tamaño en torno a los 15,0 a 18,0 Kpb, que en la primera extracción se detectó en el 51 % de los aislados y en el control positivo de *C. lirioidendri*, por su tamaño y baja nitidez podría tratarse de restos de ADN, y no de ARNdc. En el gel de electroforesis de la segunda extracción, dónde se efectuaron más lavados para eliminar más eficientemente el ADN de la celulosa, esta banda desapareció tanto en los aislados españoles seleccionados como en el control positivo de *C. lirioidendri*; mientras que las bandas correspondientes a los controles positivos de *E. festucae* y *M. cannonballus* permaneció intacta. Asimismo, después de la tercera extracción, dónde se realizaron menos lavados para favorecer la retención de ARNdc en la celulosa, el producto extraído fue digerido completamente por la enzima DNAsa tanto en los aislados españoles como en el control positivo de *C. lirioidendri*. En estos aislados no se observó en el gel de electroforesis la banda en torno a los 15,0 a 18,0 Kpb, mientras que sí en las alícuotas sin digerir. Asimismo, las bandas de ARNdc correspondientes a los controles positivos de *E. festucae* y *M. cannonballus* no fueron afectadas por la digestión.

Los resultados de estos dos análisis confirman que esta banda en torno a 15 a 18 Kpb estaba compuesta por restos de ADN que no fueron eluidos en los sucesivos lavados con STE 15 durante el proceso de extracción, y no por ARNdc. De acuerdo con nuestros resultados, los 82 aislados de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum* de vid españoles, al igual que el aislado *Cy 15* de *C. lirioidendri* de vid de Portugal, no están infectados con micovirus.

Ann y Lee (2001), relacionaron los micovirus encontrados en aislados de *C. destructans* obtenidos de gingseng con incrementos en la virulencia, esporulación y pigmentación de este hongo. En el estudio de virulencia efectuado con nuestros aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* en el Capítulo anterior, encontramos diferencias en la virulencia entre aislados de *C. macrodidymum*, sin embargo éstas variaciones no pueden relacionarse con la presencia de micovirus. Asimismo, nuestros aislados y, en general, los aislados de estas dos especies suelen presentar importantes variaciones en su morfología y pigmentación (Rego *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005) aunque, hasta la fecha, tampoco estas variaciones han podido ser asociadas a la presencia de micovirus.

Como conclusión indicar que, con el protocolo de extracción utilizado, no se detectó presencia de ARNdc en los aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* de vid evaluados, ni en el control positivo de *C. liriodendri* (aislado Cy 15) de la colección de aislados de vid de Portugal. Sin embargo, en todas las oportunidades sí se extrajeron consistentemente los ARNdc de los otros dos controles positivos utilizados, *E. festucae* y *M. cannonballus*.

CAPÍTULO 6

.....

**CONTROL *IN VITRO* DE *Cylindrocarpon*
liriodendri y *C. macrodidymum***

6- CONTROL IN VITRO DE *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*.

6.1- ANTECEDENTES

Hasta la fecha, las medidas que se recomiendan para el control del pie negro se basan en prácticas culturales para evitar el desarrollo de la enfermedad. Estas prácticas consisten en la utilización de material vegetal sano y, en prevenir o corregir las condiciones que puedan causar estrés en las plantas, tanto en los viveros como en las plantaciones definitivas (Halleen *et al.*, 2006). Asimismo, a nivel experimental se están evaluando diferentes alternativas que se muestran muy interesantes y que podrían integrarse a las anteriores dentro de un programa de manejo integrado.

Una de estas alternativas es la utilización de fungicidas. En ensayos efectuados en Portugal se encontró que los fungicidas benomilo, tebuconazol y la combinación de carbendazima + flusilazol y cyprodinil + fludioxonil mejoraron el desarrollo de plantas de vid y disminuyeron la incidencia de *C. liriodendri* (Rego *et al.*, 2006). En otro estudio realizado en Sudáfrica, fueron los fungicidas benomilo e imazalil los que lograron reducir la incidencia de plantas afectadas por *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* (Halleen *et al.*, 2007). Aunque, en este caso, los resultados obtenidos en diferentes años de experimentación fueron poco consistentes.

La termoterapia con agua caliente es otra alternativa que también está siendo evaluada, en este caso para sanear material vegetal en los viveros. Ensayos conducidos en Sudáfrica por Halleen *et al.* (2007) en condiciones semicomerciales, indicaron que la inmersión de barbados de portainjertos en estado latente en agua caliente a 50°C durante 30 minutos, parece ser suficiente para eliminar las dos especies de *Cylindrocarpon* del material vegetal.

Actualmente, en España no se dispone de información acerca del comportamiento de los fungicidas disponibles o de tratamientos con agua caliente en el control de los hongos que causan el pie negro. Por tal motivo, en este

Capítulo se pretende evaluar la eficacia *in vitro* de la aplicación de materias activas fungicidas y de la utilización de tratamientos con agua caliente en el control de aislados españoles de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

6.2- MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1- Aislados fúngicos

Para efectuar los experimentos de este apartado se utilizaron dos aislados de *C. liriodendri* y dos de *C. macrodidymum*. Éstos se seleccionaron de la colección de aislados de *Cylindrocarpon* descrita en el Capítulo 3 (Tabla 3.1). Los dos aislados de *C. liriodendri* utilizados fueron Cy 59 y Cy 88, procedentes de las provincias de Albacete y Valencia respectivamente, y los dos de *C. macrodidymum* Cy 14 y Cy 63, de las provincias de Burgos y Ciudad Real. Todos los aislados se sembraron en medio PDA y se hicieron crecer durante 10 días en estufa a 25 °C y 12 horas de fotoperiodo con luz ultravioleta cercana (Philips TDL18W/08) más iluminación fluorescente (Philips TDL18W/33).

6.2.2- Ensayos con fungicidas

El efecto de los fungicidas sobre los aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* seleccionados, fue evaluado mediante las técnicas de germinación de conidios en medio líquido y crecimiento miceliar en medio de cultivo.

Fungicidas

Las materias activas fungicidas ensayadas fueron 14, las cuales se seleccionaron de manera que estuvieran representados diferentes grupos químicos, incluyendo aquéllas actualmente autorizadas para el control de enfermedades de la madera de la vid en España (cubiet, quinosol y tebuconazol). En ambos métodos todos los fungicidas fueron evaluados con las siguientes

concentraciones: 0,1, 1, 10 y 100 mg de materia activa L⁻¹ (ppm). La descripción de estos fungicidas se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1: Principales características de las materias activas fungicidas utilizadas en los ensayos de germinación de conidios y crecimiento micelial de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

Materia activa	Grupo químico ^y	Producto comercial	Riqueza (%)	Formulación ^z
Azoxystrobin	Metoxiacrilatos	Ortiva	25	SC
Captan	Ftalamidas	Captan 50	50	WP
Carbendazima	Benzimidazoles	Quimuzin	50	SC
Cubiet	Compuestos Cúpricos	Talo-Sint	50	LS
Didecildimetil cloruro amónico	Amonio cuaternario	Sporekill	12	LS
Flusilazol	Triazoles	Olymp	10	EW
Imazalil	Imidazoles	Fecundal	7,5	LS
Iprodiona	Dicarboximidias	Parmex	50	WP
Metiltiofanato	Tiofanatos	Pelt	45	SC
Quinosol	Quinolinas	Beltanol-L	50	SC
Oxicloruro de cobre	Compuestos Cúpricos	Curenox 50	50	WP
Procloraz	Imidazoles	Sporgon	46	WP
Tebuconazol	Triazoles	Folicur	25	WG
Tiram	Ditiocarbamato	Pormasol F	80	WP

^y Según F.R.A.C (Fungicide Resistance Action Committee), (2007).

^z SC: suspensión concentrada, WP: polvo mojable, EW: emulsión de aceite en agua, WG: granulado dispersable, LS: líquido soluble.

Efecto sobre la germinación de conidios

En primer lugar, se prepararon suspensiones de conidios con cada uno de los cuatro aislados. Para ello, a cada placa se le agregó 10 mL de agua destilada estéril raspando mecánicamente la superficie con la ayuda de una espátula. La mezcla de agua con conidios se filtró a través de una malla y se diluyó con agua destilada estéril. Las suspensiones madres de conidios, obtenidas con cada aislado, se ajustaron a una concentración de $5,0 \times 10^5$ conidios mL⁻¹ con la ayuda de un hematocitómetro. Una vez ajustadas, se prepararon matraces con 50 mL de las mismas, toxicados con cada una de las concentraciones de la materia activa

fungicida a evaluar. Como testigo, se preparó otro matraz con 50 mL de suspensión de conidios sin fungicida.

A continuación, se colocaron cuatro gotas de 50 μ L procedentes de cada matraz, incluido el testigo, en dos portaobjetos (dos gotas por portaobjeto). Inmediatamente, éstos se colocaron en recipientes de plástico herméticos con un papel humedecido en su interior para favorecer el contenido de humedad y evitar el secado de las gotas. Las cámaras húmedas se introdujeron en una estufa a 25°C y en oscuridad durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar las lecturas de germinación de conidios para cada aislado, fungicida y concentración ensayada. Para ello, se cubrieron las gotas con un cubreobjetos e inmediatamente se realizó el conteo de 100 conidios por cada gota utilizando un microscopio óptico a 400 x de amplificación, registrando aquellos que estaban germinados. Un conidio se consideraba como germinado cuando el tubo germinativo superaba el largo del mismo. El porcentaje de germinación respecto al control fue calculado para cada una de las repeticiones como: $100(x/y)$ donde x = valor medio de las cuatro lecturas por cada aislado, materia activa y concentración evaluada, e y = valor medio de las cuatro lecturas del tratamiento control. El experimento se repitió dos veces.

Efecto sobre el crecimiento miceliar

El efecto de los fungicidas sobre el crecimiento miceliar se evaluó en medio de cultivo PDA, por lo cual las diferentes dosis de materia activa fueron incorporadas al medio de cultivo en el momento de su preparación. De la zona media de las colonias crecidas en PDA, se cortaron discos de agar con micelio de 4 mm de diámetro. A partir de cada aislado se sembraron cuatro discos en el centro de cuatro placas (un disco por placa), que contenían cada una de las concentraciones de la materia activa a evaluar. Como testigo se hicieron crecer cuatro discos en medio PDA sin fungicida. Las placas sembradas se introdujeron en una estufa a 25°C y en oscuridad durante diez días.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la evaluación, para lo cual se registraron dos diámetros perpendiculares por cada placa. Con estos datos se calculó el ratio de crecimiento diario de cada aislado, materia activa y concentración en mm día^{-1} . Posteriormente, se estimó el porcentaje de crecimiento diario respecto al control, que fue calculado como: $100(x/y)$ donde x = valor medio de las cuatro placas sembradas por cada aislado, materia activa y concentración, e y = valor medio de las cuatro placas control. El experimento se repitió dos veces.

Análisis de los resultados

Para poder comparar la efectividad de los fungicidas, se calculó la concentración efectiva 50 (CE 50) con aquellas materias activas que dieron respuesta inhibiendo la germinación de los conidios y/o el crecimiento miceliar. A cada dato de germinación o crecimiento miceliar de cada combinación aislado, materia activa y concentración, se le aplicó la transformación Probit; mientras que a las concentraciones ensayadas (0,1, 1, 10 y 100 ppm) se les aplicó la transformación logaritmo decimal. Con estos datos se obtuvieron rectas de regresión lineal con su ecuación correspondiente y valor de R^2 . A partir de estas ecuaciones se calculó la CE 50 como aquel valor de la concentración de la materia activa fungicida que causa el 50 % en la inhibición de la germinación de los conidios o crecimiento miceliar.

6.2.3- Ensayos de tratamientos con agua caliente

Al igual que en el caso de fungicidas, el efecto de tratamientos con agua caliente sobre los aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* seleccionados, fue evaluado mediante las técnicas de germinación de conidios y crecimiento miceliar en medio sólido.

Efecto sobre la germinación de conidios

En primer lugar, se prepararon suspensiones de conidios con cada una de los cuatro aislados de manera similar a lo indicado en los ensayos con fungicidas,

ajustándose, en este caso, a una concentración de $1,0 \times 10^6$ conidios mL^{-1} . Inmediatamente, de cada suspensión se pipeteó 1 mL a cada uno de cuatro tubos eppendorf de 1,5 mL (cuatro tubos por cada combinación de temperatura y tiempo). Los tubos se colocaron en un baño de agua caliente (PSELECTA Uniotronic 3200R, error estándar $\pm 0,1$ °C, Barcelona, España) y fueron mantenidos en agitación a cada una de las siguientes combinaciones de temperatura y tiempo: 41, 42, 43, 44, 45 y 46 °C durante 30, 45 o 60 minutos. Cada combinación de temperatura y tiempo fue ensayada separadamente.

Después del tratamiento con agua caliente, los tubos se sumergieron en agua a temperatura ambiente durante un minuto para provocar una bajada rápida de la temperatura. Inmediatamente, de cada tubo se pipeteó 0,2 mL a dos placas con medio agar agua (AA) dispersando la gota con movimientos suaves. Las placas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad durante 24 horas. Como tratamiento control se utilizó la suspensión de conidios sin tratar, para lo cual también se pipeteó 0,2 mL de la suspensión a cuatro placas de AA manteniéndose en las mismas condiciones.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la viabilidad de los conidios, para lo cual se contabilizaron 200 conidios en cada placa registrando aquéllos que estaban germinados. Un conidio se consideraba germinado cuando el tubo germinativo superaba el largo del mismo. El porcentaje de germinación respecto al control fue calculado para cada una de las cuatro repeticiones como: $100(x/y)$ donde x = valor medio de las dos placas sembradas por cada tubo, e y = valor medio de las cuatro placas control. El experimento se repitió dos veces.

Efecto sobre el crecimiento miceliar

A partir de la zona media de colonias crecidas en PDA de cada aislado, se cortaron discos de agar con micelio de 4 mm de diámetro. Dos de estos discos se colocaron dentro de cada uno de cuatro tubos eppendorf que contenían 1,5 mL de agua destilada estéril (cuatro tubos por cada combinación de temperatura y tiempo). En este caso, las temperaturas evaluadas fueron 43, 44, 45, 46, 47 y 48 °C durante 30, 45 o 60 minutos. Cada combinación de temperatura y tiempo fue ensayada separadamente.

Después del tratamiento y posterior bajada de la temperatura con agua a temperatura ambiente, los discos de agar se retiraron de los tubos y se colocaron sobre papel de filtro estéril durante unos minutos para favorecer su secado. Cada disco se depositó luego en el centro de una placa con medio MEAS y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Como tratamiento control se utilizaron cuatro discos de micelio sin tratar, los cuales se sembraron de igual forma que los tratados, en medio MEAS, e incubándose en las mismas condiciones. Tras un período de cuatro a seis días se midieron dos diámetros perpendiculares por cada colonia. El porcentaje de crecimiento micelial respecto al control fue calculado para cada una de las cuatro repeticiones como: $100(x/y)$ donde x = valor medio de las dos placas sembradas por cada tubo, e y = valor medio de las cuatro placas control. El experimento se repitió dos veces.

Análisis estadístico

Para analizar los resultados se efectuaron análisis de regresión lineal múltiple para cada aislado. Los datos de porcentaje de germinación de conidios respecto al control y porcentaje de crecimiento micelial respecto al control, fueron previamente transformados como arcoseno de $(Y/100)^{1/2}$ donde Y = germinación de conidios respecto al control o porcentaje de crecimiento micelial respecto al control. Las variables incluidas fueron experimento, que fue considerada de tipo cualitativo, y temperatura y tiempo como variables de tipo cuantitativo. En el análisis se utilizó el procedimiento de selección hacia atrás o “stepwise” de selección de variables. Para estimar el nivel de significación de las constantes y las pendientes se utilizó la prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, o $\alpha = 0,01$; mientras que para el modelo se utilizó la prueba F de Fisher con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los análisis se efectuaron mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

6.3- RESULTADOS

6.3.1- Ensayos con fungicidas

Los resultados de los valores de CE 50 para cada combinación de fungicida y concentración frente a los aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, se muestran en la Tabla 6.2. Los fungicidas evaluados presentaron una respuesta variable según el método de evaluación o el aislado utilizado.

En el ensayo de germinación de conidios, las materias activas captan y didecildimetil cloruro amónico fueron las que lograron la mayor inhibición, con valores de CE 50 inferiores a 1 ppm (de 0,38 a 0,82) (Figura 6.1). Oxiclóruo de cobre, cubiet y tiram fueron las que le siguieron en eficacia, con valores en general comprendidos entre 1 y 50 ppm (de 0,63 a 35,23 ppm). Otras materias activas como azoxystrobin, carbendazima, imazalil e iprodiona mostraron resultados más erráticos, en algunos aislados fueron efectivas para la inhibición de la germinación de conidios, pero no en otros. El resto de las materias activas, quinazol, tebuconazol, procloraz y metiltiofanato, no presentaron ninguna respuesta con ninguno de los aislados evaluados; los valores de CE 50 estuvieron siempre por encima de 100 ppm.

Los fungicidas que manifestaron un buen comportamiento en la inhibición de la germinación de conidios, en general, no lograron reducir el crecimiento micelial. Con este otro método de evaluación, las materias activas que alcanzaron buenas respuestas con valores de CE 50 en torno a 1 ppm fueron carbendazima, procloraz, imazalil y quinazol con valores comprendidos entre 0,12 y 2,94 ppm (Figura 6.2). Flusilazol, metiltiofanato y tebuconazol también mostraron buen comportamiento, aunque estos fungicidas fueron más efectivos con los aislados de la especie *C. macrodidymum* que con los de *C. liriodendri*; en los primeros con valores entorno a 1 ppm, mientras que en los segundos alrededor de 50 ppm. Otras materias activas como azoxystrobin, iprodiona y tiram lograron inhibir el crecimiento micelial de los aislados de *C. macrodidymum*, pero no los de *C. liriodendri*; mientras que con didecildimetil cloruro amónico ocurrió lo contrario. Finalmente captan, oxiclóruo de cobre y cubiet no tuvieron ningún efecto con ninguno de los aislados evaluados; los valores de CE 50 superaron las 100 ppm.

Tabla 6.2. Valores de la Concentración Efectiva 50 (mg L⁻¹ o ppm) de los 14 fungicidas evaluados en la inhibición de la germinación de conidios y crecimiento micelial en los aislados Cy 59 y Cy 88 de *C. lirioidendri* y Cy 14 y Cy 63 de *C. macrodidymum*.

Materia activa fungicida	Germinación de conidios						Crecimiento micelial					
	<i>C. lirioidendri</i>			<i>C. macrodidymum</i>			<i>C. lirioidendri</i>			<i>C. macrodidymum</i>		
	Cy59	Cy88	Cy14	Cy63	Cy59	Cy88	Cy14	Cy63	Cy59	Cy88	Cy14	Cy63
Azoxystrobin	72,29	>100 ^z	48,81	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	0,65	3,55
Captan	0,70	0,49	0,44	0,63	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Carbendazima	79,94	>100	>100	>100	0,46	0,42	0,81	1,40	0,46	0,42	0,81	1,40
Cubiet	35,23	10,16	9,38	6,19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Didecildimetil cloruro amónico	0,41	0,82	0,66	0,38	1,88	2,13	>100	>100	1,88	2,13	>100	>100
Flusilazol	>100	>100	>100	>100	36,14	27,00	0,25	0,41	36,14	27,00	0,25	0,41
Imazalil	12,09	>100	>100	5,00	1,42	1,58	1,00	1,36	1,42	1,58	1,00	1,36
Iprodiona	>100	57,94	>100	>100	>100	>100	11,17	20,61	>100	>100	11,17	20,61
Metiltiofanato	>100	>100	>100	>100	25,59	56,62	3,80	2,78	25,59	56,62	3,80	2,78
Quinosol	>100	>100	>100	>100	2,94	1,95	1,50	2,10	2,94	1,95	1,50	2,10
Oxicloruro de cobre	12,62	2,85	1,05	1,89	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Procloraz	>100	>100	>100	>100	0,17	0,16	0,12	0,17	0,17	0,16	0,12	0,17
Tebuconazol	>100	>100	>100	>100	38,00	30,00	1,17	5,25	38,00	30,00	1,17	5,25
Tiram	1,23	0,75	0,63	3,48	>100	>100	15,62	57,54	>100	>100	15,62	57,54

^z >100 indica que la CE 50 se encuentra por encima de 100 mg L⁻¹ o ppm.

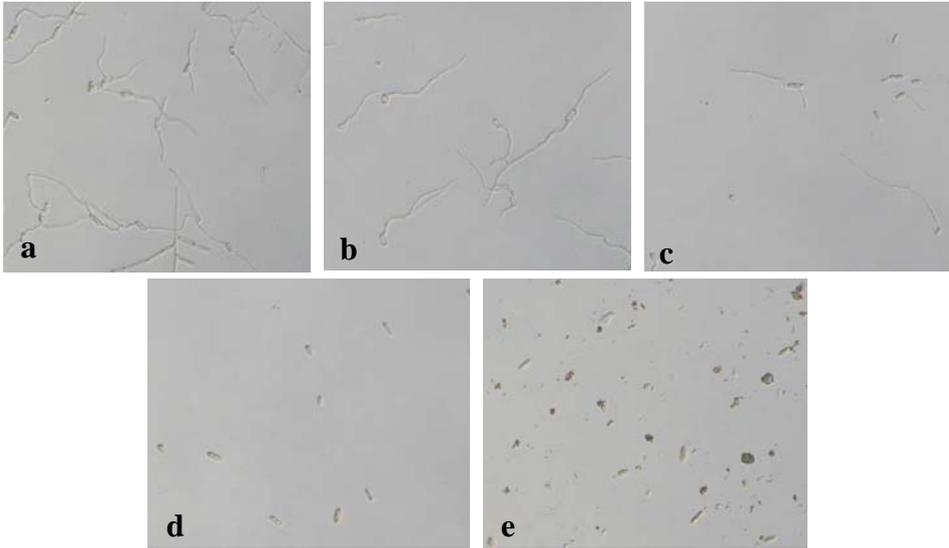


Figura 6.1. Aspecto de los conidios del aislado Cy 88 de *C. liriodendri* después de 24 horas mantenidos en solución con el fungicida captan; a) sin fungicida, b) 0,1 ppm, c) 1 ppm, d) 10 ppm, e) 100 ppm.

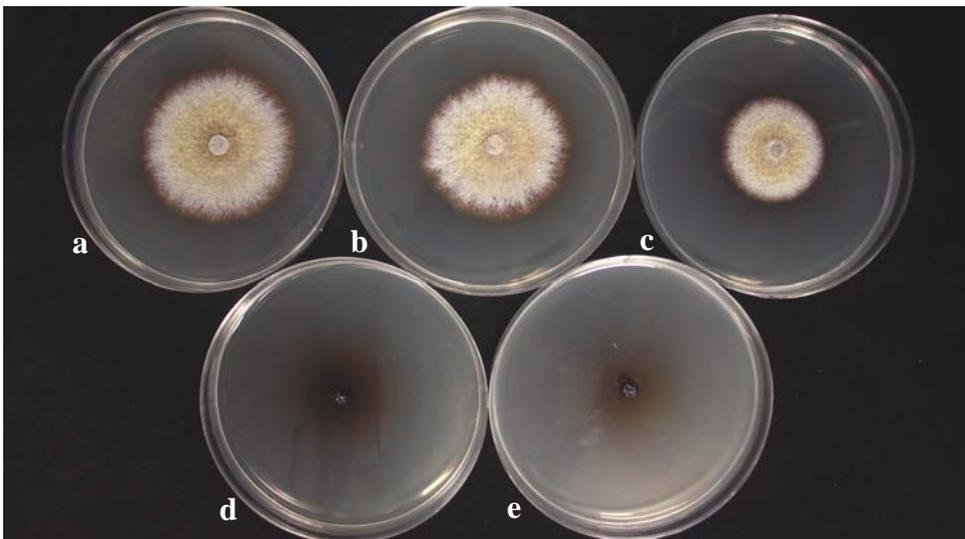


Figura 6.2. Aspecto de las colonias del aislado Cy 14 de *C. macrodidymum* después de diez días de crecimiento en medio PDA con el fungicida carbendazima; a) sin fungicida, b) 0,1 ppm, c) 1 ppm, d) 10 ppm, e) 100 ppm.

6.3.2- Ensayos de tratamientos con agua caliente

En las Figura 6.3 y 6.4 están representados los valores del efecto del tratamiento con agua caliente sobre la germinación de conidios y el crecimiento miceliar, obtenidos con cada combinación de temperatura y tiempo ensayada, en los aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* estudiados. Asimismo, en la Tabla 6.3 se muestran los resultados de las regresiones lineales múltiples efectuadas para cada aislado.

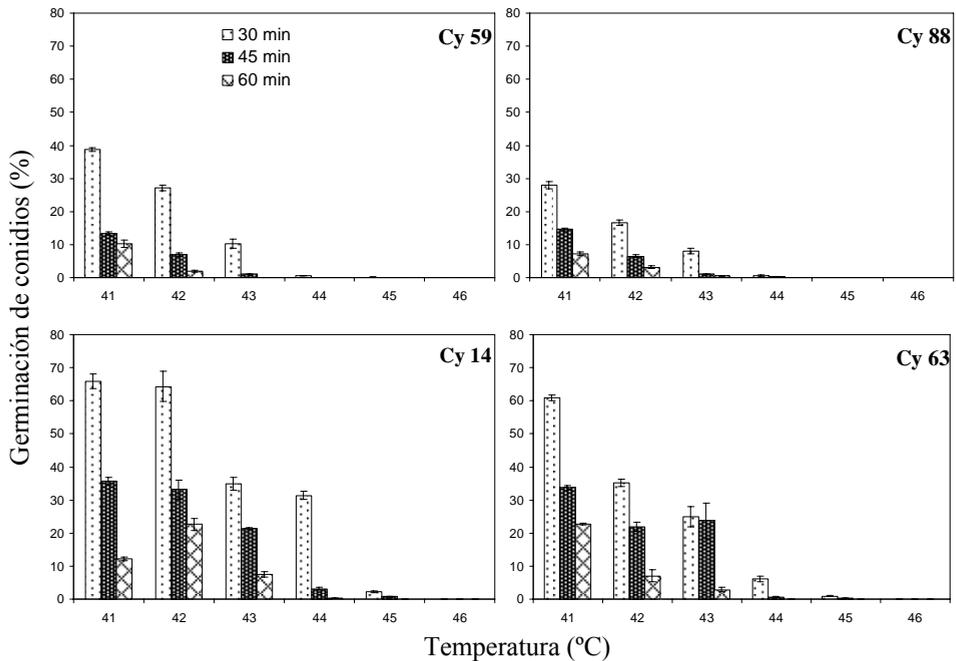


Figura 6.3. Porcentaje de germinación de conidios respecto al control de *C. liriodendri* (aislados Cy 59 y Cy 88) y *C. macrodidymum* (aislados Cy 14 y Cy 63) tras el tratamiento con agua caliente a las temperaturas de 41, 42, 43, 44, 45 y 46 °C durante 30, 45 o 60 minutos. Las barras verticales corresponden al error estándar de las medias.

Los análisis de regresión indicaron que tanto en la germinación de conidios como en el crecimiento micelial, los datos entre los dos experimentos no presentaban diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$), por lo tanto fueron analizados conjuntamente.

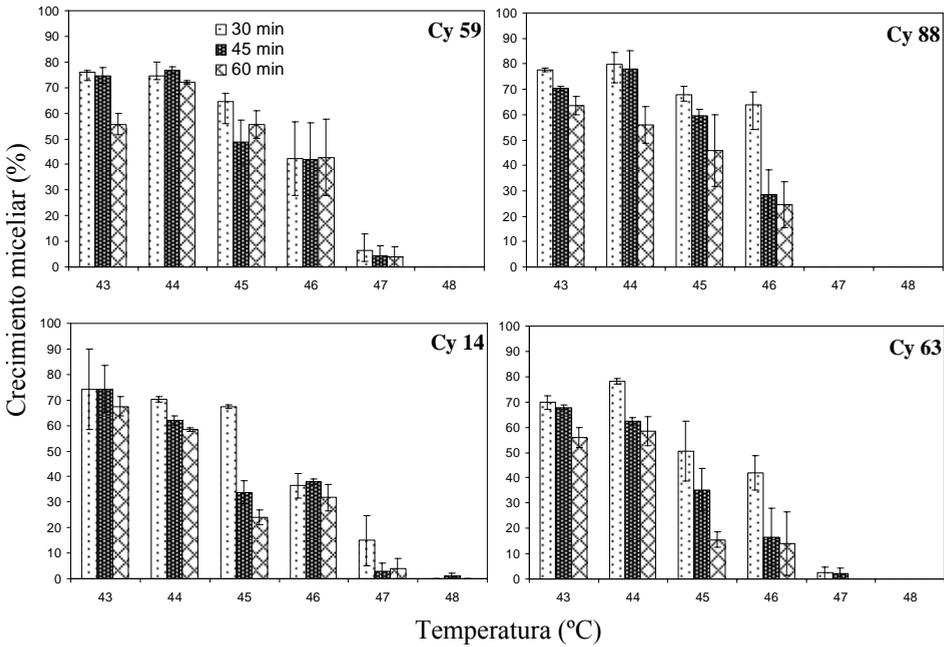


Figura 6.4. Porcentaje de crecimiento micelial respecto al control de *C. liriodendri* (aislados Cy 59 y Cy 88) y *C. macrodidymum* (aislados Cy 14 y Cy 63) tras el tratamiento con agua caliente a las temperaturas de 43, 44, 45, 46, 47 y 48 °C durante 30, 45 o 60 minutos. Las barras verticales corresponden al error estándar de las medias.

En el caso de la germinación de conidios, en general, ésta fue disminuyendo a medida que fue incrementándose la temperatura y el tiempo de tratamiento; siendo inhibida completamente a partir de 45 °C en los dos aislados de *C. liriodendri*, y a partir de 46 °C en los dos aislados de *C. macrodidymum* independientemente del tiempo de tratamiento (Figura 6.3).

Los datos transformados de porcentaje de germinación de conidios respecto al control, obtenidos de las diferentes combinaciones de temperatura y tiempo, se ajustaron de forma significativa ($P < 0,000$) a polinomios de primer orden. Los valores de R^2 se ubicaron en torno al 0,90 en los cuatro aislados. Las constantes y las pendientes de las dos variables estudiadas, temperatura y tiempo, y la interacción de ambas (temperatura x tiempo), fueron altamente significativas ($P < 0,01$). Excepto en el caso de la interacción temperatura x tiempo, las pendientes fueron siempre negativas (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Ecuaciones de regresión lineal múltiple obtenidas entre los valores de germinación de conidios y crecimiento miceliar transformados como arcoseno de $(Y/100)^{1/2}$, y las variables temperatura y tiempo para cada aislado de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum* estudiado.

	Parámetros de la regresión ^x				R^2	P-Value ^z del modelo
	b_0	b_1	b_2	b_3		
Germinación de conidios						
<i>C. lirioidendri</i>						
Cy59	673,958**	-14,9485**	-8,39219**	0,184723**	0,90	0,0000
Cy88	541,681**	-12,0225**	-6,14843**	0,135475**	0,93	0,0000
<i>C. macrodidymum</i>						
Cy14	749,172**	-16,0215**	-7,7286**	0,161273**	0,89	0,0000
Cy63	735,299**	-16,0717**	-7,30348**	0,151703**	0,91	0,0000
Crecimiento miceliar						
<i>C. lirioidendri</i>						
Cy59	630,73**	-13,1061**	ns	ns	0,73	0,0000
Cy88	667,173**	-13,5626**	-0,37070**	ns	0,77	0,0000
<i>C. macrodidymum</i>						
Cy14	603,582**	-12,2344**	-0,30904**	ns	0,81	0,0000
Cy63	609,999**	-12,3726**	-0,42595**	ns	0,77	0,0000

^x $y = b_0 + b_1 \cdot \text{temperatura} + b_2 \cdot \text{tiempo} + b_3 \cdot \text{temperatura} \times \text{tiempo}$ (y = germinación de conidios o crecimiento miceliar transformados en arcoseno de $(Y/100)^{1/2}$)

^z Prueba F de Fisher ($\alpha = 0,05$).

* ($\alpha = 0,05$); ** ($\alpha = 0,01$); ns = no significativo ($\alpha = 0,05$) prueba t de Student.

Del mismo modo, también con el método de evaluación de crecimiento miceliar, el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición causó, en

general, una disminución en el desarrollo del micelio en todos los aislados evaluados. El crecimiento miceliar fue inhibido completamente aproximadamente a partir de los 48 °C aplicados durante 60 minutos, con excepción del aislado Cy 88 de *C. liriodendri* dónde a los 47 °C, independientemente de la temperatura de exposición, ya no hubo crecimiento miceliar (Figura 6.4).

Con este otro método, los datos transformados obtenidos de las diferentes combinaciones de temperatura y tiempo, también se ajustaron significativamente ($P < 0,000$) a polinomios de primer orden. Los valores de R^2 fueron menores comparados con la germinación de conidios, con valores comprendidos entre 0,73 y 0,81. Con excepción de la pendiente asociada a la variable tiempo para el aislado Cy 59, todas las constantes y las pendientes de las variables temperatura y tiempo fueron significativas ($P < 0,01$). A su vez, en el estudio de crecimiento miceliar, en ninguno de los aislados estudiados la interacción temperatura x tiempo fue significativa ($P > 0,05$). Los valores de las pendientes fueron siempre negativos (Tabla 6.3).

6.4- DISCUSIÓN

En estudios anteriores (Rego *et al.*, 2006; Halleen *et al.*, 2007) y en el presente trabajo, se ha demostrado el potencial que tienen tanto la utilización de fungicidas como los tratamientos con agua caliente para controlar de manera eficaz a los patógenos *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

En nuestros ensayos, la respuesta de estas dos especies frente a los diferentes fungicidas ensayados fue variable dependiendo del método de evaluación utilizado. En general, las materias activas que lograron inhibir la germinación de los conidios, no fueron eficaces en la reducción del crecimiento miceliar y viceversa. Rego *et al.* (2006), en sus ensayos de evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *C. liriodendri*, también obtuvieron este tipo de respuesta con estos dos métodos de evaluación.

Los fungicidas captan, didecildimetil cloruro amónico, cubiet, oxiclورو de cobre y tiram inhibieron la germinación de los conidios de ambas especies a niveles muy satisfactorios. Captan y didecildimetil cloruro amónico fueron evaluados en Sudáfrica mediante inmersión de varetas de portainjertos en agua toxicada con estos productos. En estos experimentos, ambas materias activas lograron disminuir significativamente la incidencia de hongos en madera en planta joven (Fourie y Halleen, 2006). Por su buen comportamiento en medio líquido, estos fungicidas podrían ser utilizados en los viveros para prevenir las infecciones causadas por *Cylindrocarpon* spp. cuando las varetas de los portainjertos se sumergen en las balsas de amerado previo al injerto.

En el caso del efecto sobre el crecimiento miceliar, los fungicidas que mostraron un buen efecto fueron carbendazima, procloraz, imazalil y quinosol, y en menor medida flusilazol, metiltiofanato y tebuconazol. Utilizando este mismo método, Rego *et al.* (2006) evaluaron las materias activas procloraz, tebuconazol y la combinación de carbendazima + flusilazol para el control de *C. liriodendri*, obteniendo respuestas similares a las de nuestros ensayos. En otro trabajo realizado por Halleen *et al.* (2007), estos autores evaluaron los fungicidas imazalil, procloraz y flusilazol para el control de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, obteniendo también buenos resultados.

En nuestro estudio, los fungicidas cúpricos alcanzaron un buen comportamiento en las evaluaciones de germinación de conidios en medio líquido, pero no en las de crecimiento miceliar en medio sólido. La falta de eficacia de estos productos con la segunda técnica de evaluación, puede deberse a las características del modo de acción de los fungicidas cúpricos. Los iones Cu^{2+} son liberados y se acumulan alrededor de las estructuras del hongo impidiendo su desarrollo y causando su muerte (Martín, 1969; Miller, 1969). La utilización de un medio sólido como el método de crecimiento miceliar en placa, podría estar impidiendo la adecuada liberación y flujo de estos iones hacia las estructuras del hongo depositadas en la superficie, e interfiriendo así en su acción fungicida.

De todos los fungicidas evaluados, sólo las materias activas cubiet, quinosol y tebuconazol están actualmente autorizadas para el control de hongos de madera de la vid en España. En cuanto al didecildimetil cloruro amónico, esta

materia activa no se encuentra registrada para uso como fungicida en nuestro país. En Sudáfrica, este producto está autorizado para el control de hongos en diferentes cultivos. En el caso de la vid, para controlar los hongos que causan decaimiento, como *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp., mediante baños del material vegetal en los viveros. También se recomienda para la desinfección general del equipamiento e instalaciones utilizadas en la propagación de las plantas de este cultivo.

En cuanto a la evaluación de tratamientos con agua caliente, en general, la germinación de los conidios y el crecimiento miceliar decrecieron con el aumento de la temperatura y el tiempo de exposición en todos los aislados evaluados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Asimismo, la germinación de los conidios fue más sensible a las mismas temperaturas y tiempos en comparación con el crecimiento miceliar. Mientras que para inhibir completamente la germinación de conidios fueron suficientes tratamientos a 46 °C, para detener el desarrollo miceliar se requirieron tratamientos de, al menos, 48 °C durante 60 minutos.

Los ensayos efectuados por Halleen *et al.* (2007) en viveros de Sudáfrica, mostraron que la inmersión de barbados de portainjertos en estado latente en agua caliente a 50 °C durante 30 minutos, fue suficiente para controlar de manera eficaz a *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* del material vegetal. Antes del tratamiento, las raíces y el cuello de las plantas se encontraban infectadas con estos hongos, mientras que no fue posible aislarlos después del mismo. Además, la exposición de los portainjertos a esta temperatura no causó ningún tipo de daño fisiológico en las plantas. Los resultados de nuestro trabajo confirman que el tratamiento de 50 °C durante 30 minutos es suficiente para controlar las dos especies de *Cylindrocarpon* que causan el pie negro. No obstante, es fundamental que el tratamiento por termoterapia con agua caliente también sea capaz de controlar a otros hongos patógenos de madera de planta joven. En este sentido, en los estudios efectuados con *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp., se ha demostrado que para controlar de manera eficaz a estos hongos se requieren, en general, temperaturas más elevadas, de hasta 53- 54 °C (Whiting *et al.*, 2001; Crous *et al.*, 2001; Laukart *et al.*, 2001; Fourie y

Halleen 2004b; Waite and May, 2005; Armengol *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2008).

Como resumen, en este Capítulo se evaluó la eficacia *in vitro* de dos medidas para el control de los patógenos que causan el pie negro, el uso de materias activas fungicidas y de tratamientos con agua caliente. Con ambos métodos fue posible inhibir satisfactoriamente la germinación de los conidios y el desarrollo miceliar de aislados de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. La información obtenida en este Capítulo es de interés para futuros ensayos con material vegetal. En este sentido, la aplicación de fungicidas y de termoterapia con agua caliente, se podrían complementar a las medidas culturales ya existentes dentro de un programa de manejo integrado que permita combatir *Cylindrocarpon* spp. de manera más eficaz en los viveros.

CAPÍTULO 7



DISCUSIÓN GENERAL

7- DISCUSIÓN GENERAL

Mediante estudios moleculares y fenotípicos, se han caracterizado un total de 82 aislados de *Cylindrocarpon* obtenidos de plantas de vid con síntomas de decaimiento procedentes de viveros y de viñedos jóvenes en España. A partir de estas investigaciones se han identificado las dos especies causantes del pie negro de la vid: *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Estas mismas especies han sido citadas en otras regiones del mundo, como Sudáfrica o California, asociadas a esta enfermedad (Halleen *et al.*, 2004 y 2006b; Petit y Gubler, 2005 y 2007).

En la región BT1 del gen de la β -tubulina de los aislados de *C. macrodidymum*, existe una inserción de 52 pares de bases que es considerada un marcador específico de esta especie (Petit y Gubler, 2005). Esta inserción se encontró en 56 de nuestros aislados, mientras que el resto de los aislados, 26 en total, fueron identificados como *C. liriodendri*. A su vez, en los estudios filogenéticos de las regiones BT1 del gen de la β -tubulina e ITS del ADN ribosómico, los aislados españoles se agruparon en dos clados consistentes que se correspondieron con estas dos especies.

En esta Tesis y en otros trabajos (Rego *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2004 y Petit y Gubler, 2005) los resultados fenotípicos fueron muy variables, sin embargo esta variabilidad no permitió establecer una concordancia entre estos resultados y la descripción de las especies. Algunos investigadores aseguran que determinadas características como el tamaño de macroconidios (Halleen *et al.*, 2004) o el color del anverso de las colonias crecidas en medio MEA 2 % (Petit y Gubler, 2005) permiten diferenciar *C. liriodendri* de *C. macrodidymum*. Sin embargo, en la práctica, resultan poco resolutivas.

En este trabajo, las variables fenotípicas fueron analizadas mediante un análisis estadístico factorial multivariante, que separó a los aislados españoles en dos grupos bien diferenciados, de 26 y 56 aislados cada uno, que se correspondieron con las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* respectivamente. De acuerdo con este análisis, las dos especies pueden diferenciarse fenotípicamente dentro de una colección de aislados porque *C.*

liriodendri produce más conidios, crece más rápido a las temperaturas de 5 y 10 °C y presenta macroconidios de menor longitud y anchura que *C. macrodidymum*. A pesar de la predominancia de *C. macrodidymum* frente a *C. liriodendri* en nuestra colección, en general, ambas especies se encontraron presentes en las diferentes regiones españolas estudiadas.

En cuanto a la reproducción sexual, los teleomorfos *Neonectria liriodendri* (teleomorfo de *C. liriodendri*) y *N. macrodidyma* (teleomorfo de *C. macrodidymum*) se generaron en las dos especies y condiciones heterotálicas, coincidiendo con lo expuesto por Halleen *et al.* (2004 y 2006b). En ambos patógenos los peritecios eran de color rojo, se desarrollaron solos o agrupados y presentaban ascosporas viables en su interior en concordancia también con la descripción efectuada por estos investigadores.

La patogenicidad de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* a vid, se confirmó inoculando aislados representativos de ambas especies en barbados del portainjerto cultivar R 110. En las plantas inoculadas se observó menor desarrollo de la parte aérea, hojas cloróticas y necróticas, y necrosis en las raíces con reducción de la masa radicular. Estos síntomas se tradujeron en una disminución en el peso seco de la raíz y, en algunos casos, en el peso seco de la parte aérea. Estos resultados coinciden con lo obtenido en trabajos anteriores efectuados por Rego *et al.* (2001), Halleen *et al.* (2004) y Petit y Gubler (2005).

La técnica de análisis “Inter-Simple Sequence Repeat” (ISSR) se utilizó para analizar la diversidad genética en *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, resultando muy útil. El dendrograma obtenido con el análisis de agrupamiento de las bandas generadas con los cebadores ISSR (GT)₇, (CCA)₅, (CGA)₅ y (TCG)₅, fue robusto y estuvo de acuerdo con la identidad de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.

Dentro de la especie *C. liriodendri* se definieron dos grupos ISSR, ubicándose en uno de ellos todos los aislados de la especie (G1) con excepción del aislado Cy 67 que correspondió al segundo grupo (G2). A su vez, la similitud entre ambos grupos fue muy baja. En el Capítulo 3, el aislado Cy 67 quedó incluido dentro del clado de *C. liriodendri* en la filogenia efectuada con las

secuencias de la región BT1 del gen de la β -tubulina, pero un poco más separado en la efectuada con secuencias de la región ITS. En este trabajo, donde se ha efectuado un análisis de “fingerprinting” del ADN, se separó claramente del resto. Estos resultados sugieren que es necesario efectuar nuevas investigaciones, para clarificar su identidad ya que podría tratarse de una nueva especie. Por otro lado, dentro de la especie *C. macrodidymum* los aislados se ubicaron en cinco grupos ISSR diferentes (G3 a G7), indicando una destacada diversidad genética en esta especie que no había sido detectada ni en estudios filogenéticos previos (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005), ni en los efectuados en el Capítulo 3 de esta Tesis.

Los ensayos de patogenicidad efectuados con aislados seleccionados de los grupos ISSR de ambas especies en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo, permitieron comparar la virulencia de un número elevado de aislados en un período de tiempo muy corto. Los resultados de estos ensayos indicaron que también hay diversidad en virulencia en *C. macrodidymum*. Los aislados de los grupos ISSR G6 y G7 de *C. macrodidymum* resultaron ser más virulentos que el resto de aislados de esta especie o de *C. lirioidendri*. En ensayos previos (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005), no se habían detectado diferencias en virulencia en esta especie, posiblemente por el bajo número de aislados evaluados; y en el efectuado el Capítulo 3 de esta Tesis, no quedó incluido ninguno de los aislados de los grupos ISSR G6 o G7. Futuros ensayos de patogenicidad serán necesarios para clarificar si cualquier aislado que pudiese incluirse en uno de estos dos grupos ISSR, G6 o G7, será también más virulento que el resto de aislados de esta especie o de *C. lirioidendri*.

Con el objetivo de determinar la posible presencia de micovirus en los aislados españoles de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum*, se efectuó un estudio de detección de ARN de doble cadena (ARNdc) en todos los aislados de ambos patógenos. Los ARNdc encontrados por Ann y Lee (2001) en aislados de *C. destructans*, el hongo causante de la podredumbre de raíz en ginseng, se relacionaron con incrementos en la virulencia, esporulación y pigmentación de este hongo. Dentro de la especie *C. lirioidendri* también se detectaron ARNdc en aislados obtenidos de vid en Portugal (Nascimento *et al.*, 2007).

Sin embargo, con el método de extracción utilizado, que se basa en cromatografía en celulosa (Valverde *et al.*, 1990), no se encontró ARNdc en ninguno de los aislados españoles de *C. liriodendri* ni de *C. macrodidymum* analizados, y sí en los controles positivos: *Epichloë festucae* (Romo *et al.*, 2007) y *Monosporascus cannonballus*. Asimismo, tampoco se detectó el ARNdc de 15,0 Kpb en el control positivo de *C. liriodendri* originario de Portugal caracterizado por Nascimento *et al.* (2007). Esto indica que tanto los aislados españoles de *Cylindrocarpon* spp. como el control positivo de *C. liriodendri* de Portugal están libres de micovirus.

Respecto al control de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*, se efectuaron ensayos *in vitro* para evaluar la eficacia de tratamientos con fungicidas y con agua caliente, demostrando ambos que tienen un gran potencial para controlar de manera eficaz a estos dos patógenos.

En general, las materias activas que lograron inhibir la germinación de los conidios no fueron eficaces en la reducción del crecimiento miceliar y viceversa. Los fungicidas captan, didecildimetil cloruro amónico, cubiet, oxiclóruo de cobre y tiram inhibieron la germinación de los conidios de ambas especies a niveles muy satisfactorios. En el caso del efecto sobre el crecimiento miceliar, los fungicidas que mostraron un mejor efecto en la reducción del crecimiento fueron carbendazima, procloraz, imazalil y quinazol. Algunos de estos fungicidas ya habían sido evaluados por otros investigadores (Fourie y Halleen, 2006; Rego *et al.*, 2006; Halleen *et al.*, 2007) obteniéndose resultados similares a los de nuestro trabajo.

En cuanto al efecto de los tratamientos con agua caliente, en general, la germinación de los conidios y el crecimiento miceliar decrecieron con el aumento de la temperatura y el tiempo de exposición en los dos aislados evaluados de cada especie, siendo más sensibles los conidios que el micelio. Los tratamientos con agua caliente a 46 °C fueron suficientes para inhibir completamente la germinación de conidios de ambas especies de *Cylindrocarpon*, mientras que para detener el desarrollo miceliar se requirieron tratamientos de, al menos, 48 °C durante 60 minutos. Estos resultados confirman lo obtenido por Halleen *et al.* (2007), que demostraron que la inmersión de

barbados de portainjertos en estado latente en agua caliente durante 50 °C durante 30 minutos, es suficiente para controlar las dos especies de *Cylindrocarpon* que causan el pie negro en los viveros.

CAPÍTULO 8



CONCLUSIONES

8- CONCLUSIONES

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PATOGENICA

- ✓ A partir de una colección de 82 aislados españoles de *Cylindrocarpon* obtenidos de plantas de vid con síntomas de decaimiento procedentes de vivero y de viñedos jóvenes, se identificaron las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*.
- ✓ La identificación fenotípica de las dos especies se efectuó mediante un análisis factorial multivariante. Ambas se diferenciaron porque *C. liriodendri* produce más conidios, tiene un ratio de crecimiento diario mayor a las temperaturas de 5 y 10 °C, y presenta macroconidios de menor longitud y anchura que *C. macrodidymum*.
- ✓ El análisis de las secuencias de la región BT1 del gen de la β -tubulina y la región ITS del ADN ribosómico, identificó ambas especies entre los aislados españoles, coincidiendo este resultado con el obtenido en el análisis factorial multivariante de las variables fenotípicas.
- ✓ El estudio de cruzamiento entre aislados de *C. liriodendri* y de *C. macrodidymum* confirmó la obtención de los teleomorfos *Neonectria liriodendri* (teleomorfo de *C. liriodendri*) y *N. macrodidyma* (teleomorfo de *C. macrodidymum*).
- ✓ Ambas especies demostraron ser patógenas a vid; barbados enraizados del portainjerto cultivar R 110 inoculados con *C. liriodendri* o *C. macrodidymum* desarrollaron los síntomas típicos del pie negro.

VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE VIRULENCIA

- ✓ La técnica de análisis Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) detectó variabilidad genética en ambos patógenos, siendo ésta mucho más relevante en la especie *C. macrodidymum*.
- ✓ Los ensayos de patogenicidad efectuados con los aislados seleccionados de los grupos definidos con la técnica ISSR en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo, permitieron comparar la virulencia de un elevado número de aislados de *Cylindrocarpon* spp. en un período de tiempo corto; encontrándose que aquellos correspondientes a los grupos ISSR G6 y G7 de *C. macrodidymum*, son más virulentos que el resto de aislados de esta especie o de *C. liriodendri*

DETECCIÓN DE MICOVIRUS

- ✓ Ninguno de los 82 aislados de la colección española de *C. liriodendri* o *C. macrodidymum*, ni el control positivo de *C. liriodendri* Cy 15 originario de Portugal, están infectados con micovirus.

CONTROL IN VITRO

- ✓ Los fungicidas captan, didecildimetil cloruro amónico, cubiet, oxiclورو de cobre y tiram inhibieron satisfactoriamente la germinación de los conidios de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*; mientras que carbendazima, procloraz, imazalil y quinosol fueron los más efectivos en la reducción del crecimiento miceliar.
- ✓ Los tratamientos con agua caliente a 46 °C fueron suficientes para inhibir completamente la germinación de conidios de ambas especies de *Cylindrocarpon*; mientras que para detener el desarrollo miceliar se requirieron tratamientos de, al menos, 48 °C durante 60 minutos.

CAPÍTULO 9



BIBLIOGRAFÍA

9- BIBLIOGRAFÍA

- Ahn IP, and Lee YH. 2001.** A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 496-507.
- Anagnostakis SL, and Day PR. 1979.** Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69: 1226-1229.
- Arias-Giralda A. 1998.** Eutipiosis. En anónimo: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 4ª edición. MAPA/Mundi-Prensa. Madrid. 328 pp.
- Armengol J, Giménez-Jaime A, Vicent A, and García-Jiménez J. 2005.** Etiologie et importance des maladies du bois en Espagne. *Progrès Agricole et Viticole* 122: 130-134.
- Armengol J, Gramaje D, Salazar D, López-Cortés I, Giménez-Jaime A, Crespo E, Albaráñez EH, et García-Jiménez J. 2007.** A hot-water treatment to control *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in Spanish grapevine nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 126.
- Armengol J, Vicent A, Torné L, García-Figueres F, and García-Jiménez J. 2001a.** Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S325-S329.
- Armengol J, Vicent A, Torné L, García-Figueres F, y García-Jiménez J. 2001b.** Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Santidad Vegetal Plagas* 27: 137-153.
- Aroca A, García-Figueres F, Bracamonte L, Luque J, and Raposo R. 2006.** A survey of trunk disease within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115: 195-202.
- Aroca A, Luque J, and Raposo R. 2008.** First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevine in Spain. *Plant Pathology* 57: 386.

- Aroca A, Raposo R, Gramaje D, Armengol J, Martos S, and Luque J. 2008.** First report of *Lasiodiplodia theobromae* on rootstock mother grapevines in Spain. Plant Disease 92: 832.
- Auger J, Esterio M, and Pérez I. 2007.** First report of black foot disease of grapevine caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. Plant Disease 91: 470.
- Beltrán R, Ledó C, Vicent A, Armengol J, y García-Jiménez J. 2004.** Variabilidad temporal de la expresión de síntomas externos en una parcela de vid afectada de “yesca”. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 30: 77-84.
- Bellod M. 1947.** La yesca de la vid en la región del Levante, su influencia en la longevidad de las cepas y experiencias sobre su tratamiento. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola 15: 223-253.
- Booth, C. 1966.** The genus *Cylindrocarpon*. Mycological Papers 104: 1-56.
- Borja I, Solheim H, Hietala AM, and Fossdal CG. 2006.** Etiology and real-time polymerase chain reaction-based detection of *Gremmeniella*- and *Phomopsis*-associated disease in Norway spruce seedling. Phytopathology 96: 1305-1314.
- Bottacin AM, Lévesque CA, and Punja ZK. 1994.** Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. Phytopathology 84: 303-312.
- Brayford D, Honda BM, Mantiri FR, and Samuels GJ. 2004.** *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. Mycologia 96: 572-597.
- Campbell CL, and Madden LV. 1990.** Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 532 pp.
- Castanho B, and Butler EE. 1978.** *Rhizoctonia* decline: a degenerative disease of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 68: 1505-1510.
- Castanho B, Butler EE, and Shepherd RJ. 1978.** The association of double-stranded RNA with *Rhizoctonia* decline. Phytopathology 68: 1515-1519.

- Chu YM, Jeon JJ, Yea SJ, Kim YH, Yun SH, Lee YW, and Kim KH. 2002.** Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. Applied and Environmental Microbiology 68: 2529-2534.
- Chu YM, Lim WS, Yea SJ, Cho JD, Lee YW, and Kim KH. 2004.** Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. Virus Genes 28: 135-143.
- Crous P, and Gams W. 2000.** *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathologia Mediterranea 39: 112-118.
- Cohen S, Allasia V, Venard P, Notter S, Vernière C, and Panabières F. 2003.** Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in eastern Corsica. European Journal of Plant Pathology 109: 791-805.
- Crous P, Gams W, Wingfield MJ, and Van Wyk PS. 1996.** *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. Mycologia 88: 789-796.
- Crous WP, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, and Groenewald JZ. 2006.** Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Studies in Mycology 55: 235-253.
- Crous P, Swart L, and Coertze. 2001.** The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. Phytopathologia Mediterranea 40: S646-S466.
- Chiarappa L. 2000.** Esca (black measles) of grapevine. An overview. Phytopathologia Mediterranea 39: 11-15.
- Dhingra OD, and Sinclair JB. 1995.** Basic Plant Pathology Methods. Second Edition. CRC Press. Boca Raton. FL. USA. 434 pp.
- Dice LR, 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302.
- Dubos B. 2002.** Maladies cryptogámiques de la vigne. Éditions Féret. Bordeaux. 207 pp.

- Dubrovsky S, and Fabritius AL. 2007.** Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 46-86.
- Dupont J, Laloui W, Magnin S, Laringnon P, and Roquebert MF. 2000.** *Phaeoacremonium viticola*, a new specie associated with Esca disease of grapevine in France. *Mycologia* 92: 499-504.
- Edwards J, Marchi G, and Pascoe IG. 2001.** Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S303-S310.
- Edwards J, and Pascoe IG. 2004.** Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevine. *Australasian Plant Pathology* 33: 273-279.
- Elbakali AM, Lilja A, Hantula J, and Martin M. 2003.** Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 167-176.
- Eskalen A, Feliciano AJ, and Gubler WD. 2007.** Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease* 91: 1100-1104.
- FAO. 2008.** Datos agrícolas de FAOSTAT. Web: <http://www.fao.org>
- Fischer M. 2002.** A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1: 315-324.
- Fischer M, and Kassemeyer HH. 2003.** Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* 42: 109-116.
- Fourie PH, and Halleen F. 2004a.** Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33: 313-315.
- Fourie PH, and Halleen F. 2004b.** Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88: 1241-1245.

- Fourie PH, and Halleen F. 2006.** Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116: 255-265.
- F.R.A.C. (Fungicide Resistance Action Committee). 2007.** Fungicide list arranged by FRAC Code. Web: <http://www.frac.info/frac/index.htm>
- García-Jiménez J. 2004.** Enfermedades fúngicas de madera. p: 221-228. En: Los parásitos de la vid. Barrios-Sanromá G, Coscollá-Ramón R, Lucas-Espadas A, Pérez de Obanos-Castillos JJ, Pérez-Marín JL y Toledo-Paños J. Mundi Prensa. Madrid. España. 391 pp.
- Garrido LR, Sônego OR, and Urben AF. 2004.** *Cylindrocarpon destructans* causador do “Pie-Preto” da videira no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 29: 548-550.
- Gatica M, Césari C, Magnin S, and Dupont J. 2001.** *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing “hoja de malvón” and young vine decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S317-S324.
- Ghabrial SA. 1998.** Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16: 119-131.
- Giménez-Jaime A, Aroca A, Raposo R, García-Jiménez J, and 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.
- Glass, and Donaldson. 1995.** Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- Gramaje D, Alaniz S, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P, García-Jiménez J, and Armengol J. 2007.** First report of *Phaeoacremonium mortoniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91: 1206.
- Gramaje D, Alaniz S, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P, García-Jiménez J, and Armengol J. 2008a.** First Report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 92: 836.

- Gramaje D, García-Jiménez J, and Armengol J. 2008b.** Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatment *in vitro*. *Annals of Applied Biology* (en prensa).
- Graniti A. 2006.** From “fire esca” to “esca of grapevine”. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S5-S11.
- Graniti A, Surico G, and Mugnai L. 2000.** Esca of grapevine: a disease complex or a complex of disease? *Phytopathologia Mediterranea* 39: 16-20.
- Grasso S. 1984.** Infezioni di *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* 1: 59-63.
- Grasso S, and Magnano Di San Lio G. 1975.** Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporium* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14: 36-39.
- Gubler WD, Baumgartner K, Browne GT, Eskalen A, Rooney Latham S, Petit E, and Bayramian A. 2004.** Root disease of grapevine in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33: 157-165.
- Guerber JC, and Correll JC. 2001.** Characterization of *Glomerella acutata*, the telemorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* 93: 216-219.
- Gugino BK, and Travis JW. 2003.** Suppression of *Cylindrocarpon destructans* utilizing composted soil amendments. *Phytopathology* 93: S31.
- Halleen F, Crous PW, and Petrini O. 2003.** Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32: 47-52.
- Halleen F, Fourie PH, and Crous PW. 2006a.** A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S55-S67.
- Halleen F, Fourie PH, and Crous PW. 2007.** Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56: 637-645.
- Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, and Crous PW. 2004.** Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431-455.

- Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, and Crous PW. 2006b.** *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology* 55: 227-234.
- Hamelin RC, Bérubé P, Gignac M, and Bourassa M. 1996.** Identification of root rot in nursery seedling by nested multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4026-4031.
- Hantula J, Dusabenyagasani M, and Hamelin RC, 1996.** Random amplified microsatellites (RAMS)-a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology* 26: 159-166.
- Hantula J, Lilja A, and Parikka P, 1997.** Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycological Research* 101: 565-572.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, and Pegler DN. 1995.** Dictionary of the fungus. Ninth Edition. University Press. Cambridge. 616 pp.
- Heiniger U, and Rigling D. 1994.** Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581-599.
- Hidalgo L. 2002.** Tratado de viticultura general. Mundi-Prensa. Madrid. España. 3ª ed. 1235 pp.
- Ihrmark K, Stenström E, and Stenlid J. 2004.** Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research* 108: 149-153.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar S, Tamura K, and Nei M. 2004.** MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Larignon P, and Dubos B. 1997.** Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147-157.

- Larignon P, et Dubos B. 2001.** Le black dead arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma* 538: 26-29.
- Larignon P, Fulchic R, Cere L, and Dubos B. 2001.** Observation on black dead arm in French vineyards. *Phitopathologia Mediterranea* 40: S336-S342.
- Laukart N, Edwards J, Pascoe I, and Nguyen NK. 2001.** Curative treatments trialed on young grapevines infected with *Phaeoemoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S459-463.
- Luque J, Martos S, and Phillips AJL. 2005.** *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevine: a new species with a *Dhotiorella* anamorph. *Mycologia* 97: 1111-1121.
- MacDonald JD, and Butler EE. 1981.** *Cylindrocarpon* root rot of tulip poplar. *Plant Disease* 65: 154-157.
- Mahfuzur R, and Punja ZK. 2005.** Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 95: 1381-1390.
- Mahuku GS, Henríquez MA, Muñoz J, and Buruchara RA. 2002.** Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogens, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 92: 580-589.
- Maluta DR, et Larignon P. 1991.** Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11:71-72.
- Mantel NA, 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mantiri FR, Samuels GJ, Rahe JE, and Honda BM. 2001.** Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 79: 334-340.
- MAPA. 2007.** Anuario de estadística agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesa y Alimentación. Web: <http://www.mapya.es>

-
- Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, and Roossinck MJ. 2007.** A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515.
- Martín H. 1969.** Inorganics. p: 101-114. En: Fungicides. Volumen II. Torgeson DC. Academic Press. New York. 742 pp.
- Martin MT, and Cobos R. 2007.** Identifications of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46: 18-25.
- Martos S, y Luque J. 2004.** Identificación y caracterización de aislados del género *Botryosphaeria* en Vitis. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar (Gerona). Programa y Resúmenes 156 pp.
- Mead R, Curnow RN, and Hasted AM. 2003.** Statistical methods in agriculture and experimental biology. Third Edition CRS. Washington. 472 pp.
- Miller PM. 1969.** Mechanism for reaching the site of action. P: 2-51. En: Fungicides. Volumen II. Torgeson DC. Academic Press. New York. 742 pp.
- Mishra P, Fox RT, and Culham A. 2003.** Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analysis revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143: 291-301.
- Morton, L. 2000.** Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 59-67.
- Moster L, Groenewold JA, Summerbell RC, Gams W, and Crous P. 2006.** Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorph. *Studies in Mycology* 54: 115 pp.
- Mugnai L, Graniti A, and Surico G. 1999.** Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease* 83: 404-418.
- Nascimento T, Cardoso F, Rego C, and Oliveira H. 2007.** Presence of Double-stranded RNA molecules in *Cylindrocarpon liriodendri* isolates infecting grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 120.

- Nascimento T, Rego C, and Oliveira H. 2001.** Detection of *Cylindrocarpon* black-foot pathogens in grapevine by nested PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S357-361.
- Nascimento T, Rego C, and Oliveira H. 2007.** Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk disease. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 218-224.
- Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- Newhouse JR, Tooley PW, Smith OP, and Fishel RA. 1992.** Characterization of double-stranded RNA in isolates of *Phytophthora infestans* from Mexico, The Netherlands, and Peru. *Phytopathology* 82: 164-169.
- Nuss DL, and Koltin Y. 1990.** Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 28: 37-58.
- Pearson RC, and Goheen AC. 2001.** *Plagas y enfermedades de la vid*. APS. Minnesota. USA. Traducción: de la Iglesia González. Mundi Prensa. Madrid. 91 pp.
- Peña D. 2002.** *Análisis de datos multivariantes*. Mc Graw Hill. Madrid. 539 pp.
- Petit E, and Gubler WD. 2005.** Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89: 1051-1059.
- Petit E, and Gubler WD. 2006.** Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease* 90: 1481-1484.
- Petit E, and Gubler WD. 2007.** First report of *Cylindrocarpon liriodendri* causing black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 91: 1060.
- Petri L. 1912.** Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. *Stazione Sperimentale Agriculture Italiana* 45: 501-547.
- Petzoldt CH, Moller WJ, and Sall MA. 1981.** Eutypa dieback of grapevine: seasonal differences in infection and duration of susceptibility of pruning wounds. *Plant Disease* 71: 540-543.

- Phillips A. 1998.** *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevine in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146: 327-332.
- Phillips A. 2002.** *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3-18.
- Phillips A. 2008.** The *Botryosphaeria* site. Web: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/
- Phillips A, Alves A, Correia A, and Luque J. 2005.** Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97: 513-529.
- Phillips A, Crous PW, and Alves A. 2007.** *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusata*. *Fungal Diversity* 25: 141-155.
- Pina C, Texeiró P, Leite P, Villa P, Belloch C, and Brito L. 2005.** PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1107-1114.
- Rayner RW. 1970.** A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society.
- Reeleder RD, and Brammal RA. 1994.** Pathogenicity of *Pythium* species, *Cylindrocarpon destructans*, and *Rhizoctonia solani* to ginseng seedling in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 311-316.
- Rego C, Farropas L, Nascimento T, Cabral A, and Oliveira H. 2006.** Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S93-S100.
- Rego C, Nascimento T, and Oliveira H. 2001.** Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S343-S350.
- Rego C, Oliveira H, Carvalho A, and Phillips A. 2000.** Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 76-79.

- Rolshausen PE, Mahoney NE, Molyneux RJ, and Gubler WD. 2006.** A reassessment of the species concept in *Eutypa lata*, the causal agent of eutypa dieback of grapevine. *Phytopathology* 96: 369-377.
- Romo M, Leuchtmann A, García B, and Zabalgoeazcoa I. 2007.** A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Virus Research* 124: 38-43.
- Rossmann AY, Samuels GJ, Rogerson CT, and Lowen R. 1999.** Genera of *Bionectraceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology* 42: 1-248.
- Rumbos I, and Rumbou A. 2001.** Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S330-S335.
- Saitou N, and Nei M. 1987.** The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salazar DM, 2002.** Viticultura. El material vegetal i el seu maneig. U.P.V. Valencia. España. 499 pp.
- Samuels GJ, and Brayford D. 1990.** Variation in *Nectria radicolica* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycological Research* 94: 433-442.
- Scheck HJ, Vasquez SJ, and Gubler WD. 1998a.** First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporium*, of grapevine in California. *Plant Disease* 82: 448.
- Scheck HJ, Vasquez SJ, and Gubler WD. 1998b.** First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease* 82: 590.
- Scheck HJ, Vasquez SJ, Fogle D, and Gubler WD. 1998c.** Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture* 52: 19-23.
- Schroers HJ, Žerjab M, Munda A, and Halleen F. 2008.** *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research* 112: 82-92.

- Serra S, Borgo M, and Zanzotto A. 2000.** Investigation into the presence of fungi associated with esca of young vines. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 21-25.
- Stephens PM, Davoren CW, and Wicks T. 1999.** Effect of methyl bromide, metham sodium and the biofumigants indian mustard and canola on the incidence of soilborne fungal pathogens and growth of grapevine nursery stock. *Australasian Plant Pathology* 28: 187-196.
- Surico G. 2000.** The grapevine and wine production through the ages. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 3-10.
- Taylor A, St J Ardi GE, Wood P, and Burgess T. 2005.** Identifications and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine in western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34: 187-195.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tooley PW, O'Neill NR, Goley ED, and Carras MM. 2000.** Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analysis. *Phytopathology* 90: 1126-1130.
- Tsai PF, Pearson MN, and Beaver RE. 2004.** Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycological Research* 108: 907-912.
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, and Gubler WD. 2006.** Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490-1503.
- Valverde RA, Nameth ST, and Jordan RL. 1990.** Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
- van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, and Halleen F. 2004.** DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevine. *Mycologia* 96: 781-798.
- Vilches S, and Castillo A. 1997.** A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiology Letters* 155: 125-130.

- Waite H, and May P. 2005.** The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 144-152.
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. Pages 315-322 in: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. Academic Press. San Diego. California. 482 pp.
- Whitelaw-Weckert MA, Nair NG, Lamont R, Alonso M, Priest MJ, and Huang R. 2007.** Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon lirioidendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 36: 403-406.
- Whiting EC, Khan A, and Gubler WD. 2001.** Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85: 195-201.
- Wollenweber HW. 1913.** *Ramularia, Mycosphaerella, Nectria, Calonectria*. *Phytopathology* 3: 197-242.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, and Mao JX. 1997.** POPGENE the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta Calgary.
- Zhou S, Smith DR, and Stanosz GR. 2001.** Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 105: 919-926.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, and Labuda D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

ANEXOS



ANEXO I. Tabla de características morfológicas evaluadas en los 82 aislados españoles y 5 de referencia de *C. lirioidendri* y *C. macrodidymum*.
aislado

CL ^a	PDA					MEA 2%	
	Color anverso	Color reverso	Textura	Zonación	Margen crecimiento en agar	Pigmentos en agar	Color reverso
Cy 18	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 21	verdoso amarillo a blanco	naranja profundo a moderadamente naranja	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 23	blanco	moderadamente amarillento rosado a suave amarillo	algodonosa suave	no	entero	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 36	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	blanquecino
Cy 37	suave amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 38	blanco	grisáceo rojizo naranja a moderadamente naranja	algodonosa suave	no	entero	no	suave amarillo a blanquecino
Cy 39	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo
Cy 58	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	si	ligeramente lobulado	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 59	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 64	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	no	moderado a fuertemente amarillo
Cy 66	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo
Cy 67	amarillo blanco a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a suave amarillo
Cy 69	moderadamente amarillento rosado	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	no	moderado a fuertemente amarillo
Cy 72	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo
Cy 80	oscuro verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo

(continúa en la página siguiente)

ANEXO I. (continúa de la página anterior)

aislado	PDA					MEA 2%	
	Color anverso	Color reverso	Textura	Zonación	Margen crecimiento	Pigmentos en agar	Color reverso
Cy 85	verdoso amarillo a blanco	moderadamente rojizo marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 87	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 88	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	si	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo amarillo
Cy 89	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 90	verdoso amarillo a blanco	naranja profundo a naranja fuerte	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 91	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	blanquecino
Cy 93	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 94	oliva suave a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	si	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 97	moderado a fuertemente amarillo a blanco	oscuro rojizo marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	suave amarillo a pálido amarillo
Cy 99	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo
Cy 100	oliva suave a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 13 Portugal	oliva suave a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente naranja amarillo a pálido amarillo
Cy 15 Portugal	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	suave amarillo a pálido amarillo
CBS 117640	moderadamente amarillo a blanco	moderadamente naranja a amarillo a suave amarillo	algodonosa suave	no	entero	no	suave amarillo a pálido grisáceo amarillo
CBS 117526	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	suave amarillo a pálido amarillo

(continúa en la página siguiente)

ANEXO 1. (continúa de la página anterior)

		PDA					MEA 2%	
Cultivo	Color anverso	Color reverso	Textura	Zonación	Margen crecimiento	Pigmentos en agar	Color	
							reverso	reverso
Cy 1	blanco	naranja profundo a naranja fuerte	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 2	amarillento muy suave a blanco	naranja profundo a naranja fuerte	algodonosa	no	entero	no	blanquecino	blanquecino
Cy 3	pálido verdoso amarillo a blanco	suave amarillo	algodonosa	no	entero	no	blanquecino	blanquecino
Cy 9	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a moderadamente naranja	algodonosa	no	lobulado	no	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 12	pálido verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	si	blanquecino	blanquecino
Cy 14	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	moderadamente	amarillento naranja a fuertemente amarillo
Cy 15	amarillo blanco a blanco	Amarillo blanco a blanco	algodonosa	no	entero	no	blanquecino	blanquecino
Cy 16	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 17	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	si	entero	si	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 19	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	moderado a fuertemente	amarillento grisáceo a pálido grisáceo
Cy 22	amarillo blanco a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 25	pálido verdoso amarillo a blanco	naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo	amarillo a blanquecino
Cy 28	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	suave amarillo a blanquecino	blanquecino
Cy 29	suave amarillo a blanco	moderadamente naranja a moderadamente amarillento rosado	algodonosa suave	no	entero	no	suave amarillo a blanquecino	blanquecino
Cy 32	pálido verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	pálido amarillo a blanquecino	blanquecino

(continúa en la página siguiente)

ANEXO 1. (continúa de la página anterior)

		PDA					MEA 2%
CM ^b	Color anverso	Color reverso	Textura	Zonación	Margen crecimiento	Pigmentos en agar	Color reverso
	Cy 33	moderadamente amarillo a blanco blanco	moderadamente marrón a naranja profundo suave amarillento	algodonosa suave algodonosa	no no	ligeramente lobulado entero	no no
Cy 40	pálido verdoso amarillo a blanco	naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 41	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	si	entero	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 42	amarillo blanco a casi todo blanco	moderadamente naranja	algodonosa suave	no	entero	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 43	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo a amarillo	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo amarillo
Cy 45	moderado a fuertemente amarillo a blanco	naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	pálido grisáceo amarillo
Cy 47	suave amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 48	suave amarillo a blanco	naranja profundo a naranja fuerte	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 49	amarillo blanco a blanco	moderado a fuertemente amarillo a naranja profundo	algodonosa	no	entero	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 57	suave amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo
Cy 60	moderado a fuertemente amarillo	moderadamente marrón	algodonosa	no	lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 61	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo
Cy 62	suave amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	entero	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 63	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	pálido grisáceo amarillo a blanquecino

(continúa en la página siguiente)

ANEXO I. (continúa de la página anterior)

CM ^b	PDA					MEA 2%	
	Color anverso	Color reverso	Textura	Zonación	Margen crecimiento	Pigmentos en agar	Color reverso
Cy 65	moderado a fuertemente amarillo	moderadamente marrón	algodonosa	no	lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 68	verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo blanquecino
Cy 70	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	blanquecino
Cy 71	blanco	suave verdoso amarillo	algodonosa	no	entero	no	blanquecino
Cy 73	oliva suave a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 74	pálido verdoso amarillo a blanco	suave amarillo a naranja profundo	algodonosa	si	ligeramente lobulado	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino
Cy 75	blanco	suave verdoso amarillo	algodonosa	no	entero	no	blanquecino
Cy 76	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo
Cy 77	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 78	amarillo fuerte a blanco	suave amarillo a suave verdoso amarillo	algodonosa	no	entero	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo
Cy 79	blanco	suave verdoso amarillo	algodonosa	no	entero	no	blanquecino
Cy 81	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 82	fuerte amarillo verde	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 83	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	naranja profundo a moderadamente naranja amarillo
Cy 84	amarillo fuerte a blanco	suave amarillo	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino

(continúa en la página siguiente)

ANEXO 1. (continúa de la página anterior)

CM ^b	PDA							Color reverso	Color reverso
	Color anverso	Color	Textura	Zonación	Margen crecimiento	Pigmentos en agar	ME A 2%		
Cy 84	amarillo fuerte a blanco	suave amarillo	algodonosa	no	entero	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino		
Cy 86	blanco a fuerte naranja	naranja fuerte	algodonosa	si	lobulado	no	fuerte naranja a blanquecino		
Cy 92	oliva suave a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo		
Cy 95	suave amarillo verde a grisáceo amarillo	moderadamente marrón	algodonosa	no	ligeramente lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo		
Cy 96	amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo		
Cy 98	amarillo fuerte a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo a suave amarillo	algodonosa	si	entero	no	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo amarillo		
Cy 101	pálido verdoso amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo a blanquecino		
Cy 102	moderadamente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	lobulado	si	moderadamente amarronado naranja a pálido amarillo		
Cy 103	moderado a fuertemente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo a moderadamente amarillento rosado	algodonosa	no	entero	no	moderadamente amarronado naranja a pálido amarillo		
Cy 104	moderado a fuertemente amarillo	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa	no	entero	no	moderado a fuertemente amarillo a pálido grisáceo amarillo		
Cy 105	moderadamente amarillo a blanco	moderadamente marrón a naranja profundo	algodonosa suave	no	ligeramente lobulado	no	moderadamente amarronado naranja a fuertemente amarillo		
Cy 106	blanco	moderadamente amarillo	algodonosa suave	no	entero	no	pálido grisáceo amarillo a blanquecino		
CBS 112609	moderado a fuertemente amarillo	moderadamente marrón a amarillo a suave amarillo	algodonosa	no	entero	no	--		

^aCL: *C. lirioidendri*, ^bCM: *C. macrodindynum*.

ANEXO 2. Tabla de variables fenotípicas evaluadas en los 82 aislados españoles y 5 de referencia de *C. lariodendri* y *C. macrodidymum*.

aislado CL ^c	Ratio de crecimiento diario a diferentes temp. (mm d ⁻¹) ^a					Longitud y anchura de los conidios (µm) ^b										tam. clamid. (µm) ^c	Log ₁₀ conid. mL ⁻¹ ^d
	35° C					0 tab.		1 tab.		2 tab.		3 tab.		3 tab. anch.			
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35° C	long.	anch.	long.	anch.	long.	anch.				
Cy18	0,34	0,73	1,09	1,64	1,80	1,18	0,00	8,4	3,1	13,2	4,3	23,8	5,0	26,7	5,0	10,6	6,3
Cy21	0,29	0,78	1,23	1,84	2,04	1,35	0,00	8,1	3,3	15,6	4,5	26,7	5,0	28,3	5,0	10,4	5,7
Cy23	0,46	0,82	1,63	2,68	2,80	1,51	0,00	8,2	3,2	14,2	4,0	22,1	5,0	24,6	5,0	8,6	5,5
Cy36	0,33	0,73	1,17	1,88	2,10	1,70	0,00	8,2	3,2	14,3	4,3	22,9	5,0	25,8	5,2	10,9	5,8
Cy37	0,28	0,74	1,24	1,53	1,73	1,10	0,00	8,1	3,1	16,9	4,4	25,0	5,0	27,8	5,2	11,4	5,8
Cy38	0,42	0,85	1,69	2,56	2,57	1,26	0,00	7,3	3,2	13,8	4,0	21,3	5,0	23,1	5,2	9,6	5,5
Cy39	0,35	0,71	1,10	1,55	1,93	1,19	0,00	8,4	3,2	16,0	4,3	22,1	4,8	24,3	5,0	10,8	5,7
Cy58	0,30	0,66	1,23	2,18	2,48	1,23	0,00	7,6	3,0	15,2	4,3	21,6	5,0	23,3	5,0	9,8	5,8
Cy59	0,32	0,75	1,10	1,67	1,91	1,19	0,00	9,0	3,1	14,2	3,9	20,4	4,8	24,2	5,0	10,2	6,0
Cy64	0,23	0,74	1,33	2,45	2,46	1,23	0,00	9,0	3,3	16,7	4,3	24,6	5,2	30,2	5,7	10,6	5,5
Cy66	0,28	0,67	1,01	1,79	1,96	1,16	0,00	8,6	3,5	16,2	4,2	25,8	5,2	30,3	5,4	11,6	5,5
Cy67	0,23	0,74	1,92	2,59	3,69	1,39	0,00	8,1	3,6	19,8	5,1	21,7	4,8	27,5	5,2	11,3	5,9
Cy69	0,21	0,70	1,13	1,88	2,34	1,36	0,00	8,8	3,1	15,2	4,3	23,1	4,7	25,4	5,0	12,5	5,8
Cy72	0,30	0,73	1,11	1,65	2,03	1,39	0,00	8,6	3,4	15,6	4,5	22,5	5,2	29,1	5,5	12,3	5,6
Cy80	0,36	0,68	1,19	1,99	2,08	0,97	0,00	8,9	3,2	17,6	4,3	22,5	4,7	28,0	5,3	10,0	5,6
Cy85	0,32	0,77	1,25	1,58	2,08	1,41	0,00	9,1	3,2	19,1	4,4	23,5	5,0	32,3	5,5	11,3	5,8
Cy87	0,31	0,71	1,19	1,73	2,28	1,21	0,00	9,5	3,2	16,4	4,3	23,8	4,6	28,8	5,3	9,3	5,7
Cy88	0,33	0,70	1,19	1,58	1,76	1,12	0,00	8,5	3,1	16,9	4,3	23,1	5,2	27,5	5,3	15,8	5,3
Cy89	0,33	0,61	1,19	1,92	2,09	1,61	0,00	9,2	3,3	14,6	4,1	22,9	4,8	27,2	5,2	8,9	6,0
Cy90	0,31	0,69	1,52	1,96	2,41	1,66	0,00	8,8	3,3	14,3	4,1	23,3	5,0	24,6	5,0	10,3	5,8
Cy91	0,32	0,73	1,13	1,63	1,92	1,21	0,00	9,4	3,4	17,2	4,5	22,8	4,8	29,8	5,4	10,6	5,7
Cy93	0,31	0,76	1,16	1,91	1,96	1,37	0,00	9,6	3,6	15,5	4,4	23,3	5,2	27,8	5,3	10,5	5,7
Cy94	0,19	0,46	1,04	1,49	1,87	1,37	0,00	9,1	3,2	15,2	4,3	25,4	5,2	28,3	5,6	11,6	5,3

(continúa en la página siguiente)

