

## Resum

Des de principis dels anys 1990, s'ha constatat una alta mortalitat de plantes joves de vinya, tant en vivers com en plantacions joves, en totes les àrees vitivinícoles del món. Les malalties de la fusta es troben entre les patologies més greus que afecten al cultiu de la vinya. De entre elles, el peu negre és una de les més destacades, afectant principalment a les plantes en el viver i en plantacions joves. Els agents causals d'aquesta malaltia estan inclosos dins dels gèneres *Campylocarpon*, "*Cylindrocarpon*", *Cylindrocladiella* i *Ilyonectria*. Els fongs inclosos en aquestos gèneres es caracteritzen per ser habitants del sol i, durant els últims anys, s'ha demostrat que poden romandre en ell, infectant el material de propagació cultivat en els camps de viver durant la fase de enraïment. No obstant això, la presència de fongs associats al peu negre de la vinya en viver, així com les seves fonts potencials d'inòcul, tant en sols de viver com en sols de vinya comercials, no han estat mai estudiats a Espanya. En este sentit, el principal objectiu d'aquesta Tesi ha estat estudiar l'epidemiologia de fongs que causen el peu negre de la vinya a Espanya.

En primer lloc, les diferents fases del procés viverístic van ser avaluades com a fonts potencials d'inòcul de fongs que causen el peu negre de la vinya. Per a això, es van prendre mostres en quatre fases del procés de propagació: basses d'hidratació, tisores, màquines empeltadores i torba utilitzada per a la inducció del call. Posteriorment, es va extraure el ADN d'aquestes mostres, detectant les espècies causants del peu negre de la vinya mitjançant multiplex, nested PCR, utilitzant tres parells de encebadors específics per a *I. liriodendri*, el complex *I. macrodidyma* i "*C.*" *pauciseptatum*. En les diferents fases estudiades es detectaren *I. liriodendri* i el complex *I. macrodidyma*. A més a més, també es va estudiar la detecció d'espècies d'*Ilyonectria* en material de propagació de vinya, avanç i després de la fase d'enraïment en camps de viver, mitjançant tècniques d'aïllament i multiplex, nested PCR. Aquest estudi confirma que el nombre de plantes infectades amb espècies associades al peu negre de la vinya augmenta considerablement durant el procés d'enraïment en els camps de viver. No obstant això, les espècies *I. liriodendri*, *I. novozelandica* i *I. torresensis* s'aïllaren freqüentment de les arrels de les plantes després del període de cultiu en els camps de viver. Respecte a la detecció molecular, es detectaren un nombre elevat de mostres positives tant en planta empeltada després de la inducció del call com després del procés de enraïment en camp de viver.

Mitjançant l'ús de quatre tècniques diferents, aïllament fúngic a partir d'arrels de plàntules de vinya obtingudes de llavor que es van utilitzar com a plantes parany, aïllament a partir d'arrels de males herbes, multiplex, nested PCR i qPCR, es va estudiar el sol de camps de plantes mare de vinya com a possible font d'inòcul de fongs associats al peu negre de la vinya. A partir d'arrels de plantes parany cultivades en camps de plantes mare s'aïllaren quatre espècies d'*Ilyonectria*: *I. alcacerensis*, *I. macrodidyma*, *I. novozelandica* i *I. torresensis*. "*Cylindrocarpon*" *macrodidymum* fou la única espècie que es va aïllar de les arrels de males herbes recollides en camps de plantes mare, mostrant un elevat percentatge d'aïllament. En els anàlisis de sols de camps de plantes mare realitzats mitjançant multiplex, nested PCR, així com mitjançant qPCR s'observà un elevat percentatge de detecció del complex *I. macrodidyma* en

mostres de ADN de sol, mentre que el percentatge de detecció de *I. liriodendri* fou molt menor.

Aquestes mateixes tècniques descrites per a camps de plantes mare es van utilitzar per a estudiar els sols de camps de viver y camps de vinya comercials. En camps de viver, els resultats obtinguts mitjançant l'ús de plantes parany foren similars als obtinguts en camps de plantes mare. En aquest cas, de les arrels de les plantes parany s'aïllaren les espècies *I. alcacerensis*, *I. macrodidyma*, *I. novozelandica* i *I. torresensis*. A més a més, "*Cylindrocarpon*" *macrodidymum* també s'aïllà amb elevada freqüència de les arrels de males herbes recollides en camps de viver, mostrant un elevat percentatge d'aïllament. En el anàlisi de sols de camps de viver realitzats mitjançant multiplex, nested PCR, així com mitjançant qPCR, s'observaren resultats molt pareguts als obtinguts en camps de plantes mare, detectant freqüentment el complex *I. macrodidyma* en mostres de ADN de sol, mentre que la freqüència de detecció d'*I. liriodendri* fou molt menor. Respecte al sol de camps comercials, les espècies *I. alcacerensis*, *I. novozelandica* i *I. torresensis* s'aïllaren d'arrels de plantes parany cultivades en test contenint sols procedents de deu camps de vinya comercials. "*Cylindrocarpon*" *macrodidymum* també s'aïllà amb elevada freqüència de les arrels de males herbes recollides en vinyers comercials, mostrant un elevat percentatge d'aïllament.

És important destacar que les espècies compreses dins del complex *I. macrodidyma* foren les que s'aïllaren amb major freqüència en tots els tipus de sol estudiats: sols de camp de plantes mare, de camps d'enrillament y de camps comercials.

Finalment, es va estudiar l'efecte de la temperatura, pH i el potencial osmòtic ( $\Psi_s$ ) sobre el creixement micelià, la esporulació i la producció de clamidòspores de "*C.*" *liriodendri*, "*C.*" *macrodidymum* i "*C.*" *pauciseptatum*, amb l'objectiu de millorar el coneixement dels factors que afecten al creixement, reproducció i supervivència d'aquestos patògens. Tots els aïllats estudiats foren capaços de créixer en un rang de temperatures comprés entre 5 i 30°C, amb un òptim de temperatura entre 20 i 25°C. També s'observà creixement micelià en un rang de pH comprés entre 4 i 8. Respecte a l'efecte del  $\Psi_s$ , en general, el creixement micelià fou millor en medi de cultiu PDA ajustat a -0,5, -1,0 i/o -2,0 MPa en comparació amb el creixement micelià observat en PDA sense ajustar a cap  $\Psi_s$  (-0,3 MPa), reduint se a valors de  $\Psi_s$  per davall de -2,0 MPa. La majoria dels aïllats de "*Cylindrocarpon*" *liriodendri* mostraren una major capacitat d'esporulació en comparació amb "*C.*" *macrodidymum* i "*C.*" *pauciseptatum* a totes les condicions estudiades. En general, la producció de clamidòspores no es va veure afectada per la temperatura, el pH i el  $\Psi_s$ . A tots els valors de pH estudiats s'observaren clamidòspores en tots els aïllats cultivats en PDA, mentre que a 5 i 10°C o a -4,0 i/o -5,0 MPa alguns d'ells no produïren clamidòspores.

A més a més, en aquesta Tesi, també es detectaren algunes espècies que causen la malaltia de Petri a partir dels aïllaments realitzats en plantes parany i en males herbes. Les espècies *Cadophora luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* i/o *Phaeomoniella chlamydospora* s'aïllaren a partir dels teixits xilemàtics de les plantes parany cultivades tant en els camps de plantes mare com en els camps de

viver, així com a partir dels teixits xilemàtics de males herbes recollides en camps de plantes mare, camps de viver i camps de vinya comercials.