

Resumen

Desde principios de los años 1990, se viene observando una elevada mortalidad de plantas jóvenes de vid, tanto en vivero como en plantaciones jóvenes, en todas las áreas vitivinícolas del mundo. Las enfermedades de la madera se encuentran entre las patologías más dañinas que afectan al cultivo de la vid. De entre ellas, el pie negro es una de las más destacadas, afectando principalmente a las plantas en vivero y en plantaciones jóvenes. Los agentes causales de esta enfermedad están incluidos dentro de los géneros *Campylocarpon*, "*Cylindrocarpon*", *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria*. Los hongos incluidos en estos géneros se caracterizan por ser habitantes comunes del suelo y, en los últimos años, se ha demostrado que pueden permanecer en él, infectando al material de propagación cultivado en los campos de vivero durante la fase de enraizamiento. Sin embargo, la presencia de hongos asociados al pie negro de la vid en vivero, así como sus fuentes potenciales de inóculo tanto en suelos de vivero como en suelos de viñedos comerciales, no han sido nunca estudiados en España. En este sentido, el principal objetivo de esta Tesis ha sido estudiar la epidemiología de hongos que causan el pie negro de la vid en España.

En primer lugar, las distintas fases del proceso viverístico se evaluaron como fuentes potenciales de inóculo de hongos que causan el pie negro de la vid. Para ello, se tomaron muestras en cuatro fases del proceso de propagación: balsas de hidratación, tijeras, máquinas injertadoras y turba utilizada para la inducción del callo. Posteriormente, se extrajo el ADN de estas muestras, detectándose las especies causantes del pie negro de la vid mediante multiplex, nested PCR utilizando tres pares de cebadores específicos para *I. liriodendri*, el complejo *I. macrodidyma* y "*C.*" *pauciseptatum*. En las distintas fases estudiadas se detectaron *I. liriodendri* y el complejo *I. macrodidyma*. Además, también se estudió la detección de especies de *Ilyonectria* en material de propagación de vid, antes y después de la fase de enraizamiento en campos de vivero, mediante técnicas de aislamiento y multiplex, nested PCR. Este estudio confirmó que el número de plantas infectadas con especies asociadas al pie negro de la vid aumenta considerablemente durante el proceso de enraizamiento en los campos de vivero. *Ilyonectria torresensis* fue la única especie que se aisló de las plantas injertadas después de la fase de inducción del callo. Sin embargo, las especies *I. liriodendri*, *I. novozelandica* e *I. torresensis* se aislaron frecuentemente de las raíces de las plantas tras el período de cultivo en los campos de vivero. Respecto

a la detección molecular, se detectaron un número elevado de muestras positivas tanto en planta injertada tras la inducción del callo como después del proceso de enraizamiento en campo de vivero.

Mediante el uso de cuatro técnicas diferentes, aislamiento fúngico a partir de raíces de plántulas de vid obtenidas de semilla que se utilizaron como plantas trampa; aislamiento a partir de raíces de malas hierbas; multiplex, nested PCR y qPCR, se estudió el suelo de campos de plantas madre de viña como posible fuente de inóculo de hongos asociados al pie negro de la vid. A partir de raíces de plantas trampa cultivadas en campos de plantas madre se aislaron cuatro especies de *Ilyonectria*: *I. alcacerensis*, *I. macrodidyma*, *I. novozelandica* e *I. torresensis*. “*Cylindrocarpon*” *macrodidymum* fue la única especie que se aisló de las raíces de malas hierbas recogidas en campos de plantas madre, mostrando un elevado porcentaje de aislamiento. En los análisis de suelos de campos de plantas madre realizados mediante multiplex, nested PCR así como mediante qPCR se observó un elevado porcentaje de detección del complejo *I. macrodidyma* en muestras de ADN de suelo, mientras que el porcentaje de detección de *I. liriodendri* fue mucho menor.

Las mismas técnicas descritas para campos de plantas madre se utilizaron para estudiar los suelos de campos de vivero y de viñedos comerciales. En campos de vivero, los resultados obtenidos mediante el uso de plantas trampa fueron similares a los obtenidos en campos de plantas madre. En este caso, de las raíces de las plantas trampa se aislaron las especies *I. alcacerensis*, *I. macrodidyma*, *I. novozelandica* e *I. torresensis*. Además, “*Cylindrocarpon*” *macrodidymum* también se aisló con elevada frecuencia de las raíces de malas hierbas recogidas en campos de vivero. En los análisis de suelos de campos de vivero realizados mediante multiplex, nested PCR, así como mediante qPCR, se observaron resultados muy parecidos a los obtenidos en campos de plantas madre, detectándose frecuentemente el complejo *I. macrodidyma* en muestras de ADN de suelo, mientras que la frecuencia de detección de *I. liriodendri* fue mucho menor. Respecto al suelo de campos comerciales, las especies *I. alcacerensis*, *I. novozelandica* e *I. torresensis* se aislaron de raíces de plantas trampa cultivadas en macetas conteniendo suelos procedentes de diez viñedos comerciales. “*Cylindrocarpon*” *macrodidymum* también se aisló con elevada frecuencia a partir de raíces de malas hierbas recogidas en viñedos comerciales, mostrando un elevado porcentaje de aislamiento. Es importante destacar que las especies comprendidas dentro del complejo

I. macrodidyma fueron las que se aislaron con mayor frecuencia en todos los tipos de suelos estudiados: suelos de campos de plantas madre, de campos de enraizamiento y de campos comerciales.

Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura, pH y potencial osmótico (Ψ_s) sobre el crecimiento micelial, la esporulación y la producción de clamidosporas de “*C.*” *liriodendri*, “*C.*” *macrodidymum* y “*C.*” *pauciseptatum*, con el objetivo de mejorar el conocimiento de los factores que afectan al crecimiento, reproducción y supervivencia de estos patógenos. Todos los aislados estudiados fueron capaces de crecer en un rango de temperaturas comprendido entre 5 y 30°C, con un óptimo de temperatura entre 20 y 25°C. También se observó crecimiento micelial en un rango de pH comprendido entre 4 y 8. Respecto al efecto del Ψ_s , en general, el crecimiento micelial fue mejor en medio de cultivo PDA ajustado a -0,5, -1,0 y/o -2,0 MPa en comparación con el crecimiento micelial observado en PDA sin ajustar a ningún Ψ_s (-0,3 MPa), reduciéndose a valores de Ψ_s por debajo de -2,0 MPa. La mayoría de los aislados de “*Cylindrocarpon*” esporularon a todas las temperaturas, pHs y valores de Ψ_s estudiados. “*Cylindrocarpon*” *liriodendri* mostró una mayor capacidad de esporulación en comparación con “*C.*” *macrodidymum* y “*C.*” *pauciseptatum* en todas las condiciones estudiadas. En general, la producción de clamidosporas no se vio afectada por la temperatura, el pH y el Ψ_s . A todos los valores de pH estudiados se observaron clamidosporas en todos los aislados cultivados en PDA, mientras que a 5 y 10°C o a -4,0 y/o -5,0 MPa algunos de ellos no produjeron clamidosporas.

Además, en esta Tesis, también se detectaron algunas de las especies que causan la enfermedad de Petri en vid a partir de los aislamientos realizados en plantas trampa y en malas hierbas. Las especies *Cadophora luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. parasiticum* y/o *Phaeomoniella chlamydospora* se aislaron a partir de los tejidos xilemáticos de las plantas trampa cultivadas tanto en los campos de plantas madre como en los campos de vivero, así como a partir de los tejidos xilemáticos de malas hierbas recogidas en campos de plantas madre, campos de vivero y viñedos comerciales.