

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



Identificación de especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* asociadas al pie negro de la vid en Castilla La Mancha.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN SANIDAD Y PRODUCCION VEGETAL

ALUMNO: VÍCTOR MANUEL TOLOSA ALMENDROS

TUTOR: JOSEP ARMENGOL FORTÍ

COTUTOR: RAMONA MARÍA MUÑOZ GÓMEZ

Curso Académico: 2014 - 2015

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerle al Dr. Josep Armengol por toda la ayuda y el tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo.

También quisiera agradecerle a la Dra. Rami Muñoz por ser mi tutora en el ITAP y por haberme permitido realizar este trabajo cerca de casa.

Además tengo que darle las gracias a la Dra. Maela León por toda la ayuda y por todo lo que me ha enseñado para la realización de este trabajo

Asimismo quiero darle las gracias a todas las personas del laboratorio del SEDAF con las que he coincidido en la realización de este trabajo, Mara, Cecilia, Rita, Puri y Alejandra, por lo bien que me han tratado.

También a mis compañero del máster por todos los buenos momentos compartidos durante este año.

Por último quisiera agradecerle a mi familia el apoyo y la confianza que tienen siempre en mí.

RESUMEN

El pie negro es una de las enfermedades de la madera de la vid que presenta mayor gravedad en la actualidad. Esta patología está causada por hongos del suelo pertenecientes a varios géneros y es una de las alteraciones más frecuentes en planta joven en España y, especialmente, en viñedos de Castilla La Mancha. Desde el año 2002, las consultas relativas a plantas jóvenes de vid con síntomas de decaimiento han sido frecuentes en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), siendo los hongos asociados a la enfermedad del pie negro los detectados con mayor frecuencia. El SEDAF realiza la identificación de estos hongos a partir características fenotípicas, sin embargo este sistema no es el más adecuado porque, por su complejidad, dificulta la correcta identificación de las diferentes especies implicadas. Por ello el objetivo principal de este trabajo fue el establecimiento de un sistema de identificación molecular de especies fúngicas asociadas al pie negro de la vid en el laboratorio del SEDAF. Este sistema se basa en el establecimiento de cultivos monospóricos, la extracción de DNA, la amplificación de este por PCR, utilizando una pareja de cebadores correspondientes al gen de la histona H3, la secuenciación de los productos de PCR y su posterior análisis filogenético. Los resultados de este trabajo mostraron que se la implantación con éxito de esta metodología en el SEDAF, y permitiendo completar la identificación a nivel de especie de 26 aislados procedentes de vid con sistemas de decaimiento, recogidos durante los años 2014 y 2015. Éstos fueron identificados como pertenecientes a las especies: *Dactylonectria torresensis*, *D. alcacerensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma* e *Ilyonectria lirioidendri*.

Palabras clave: Pie negro; *Ilyonectria*; *Dactylonectria*; Análisis filogenético; PCR; *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

Black foot is one of the most serious grapevine trunk diseases worldwide. This disease is caused by soilborne fungal species included into several genera and it is one of the most common diseases in young vines in Spain, especially in Castilla La Mancha region. Since 2002, the cases of young vines showing decline symptoms, analysed by the Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) from the Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) have increased, being the fungi associated with black foot disease the most frequently detected. Fungal identification on this laboratory is currently based only on morphological data, however this methodology shows several disadvantages that hinder the correct species identification. The main aim of the present study was to set up a molecular method for the accurate identification of black foot pathogens in the SEDAF laboratory. This method is based on monosporic cultures establishment, DNA extraction, DNA amplification by PCR using a set of primers for histone H3 gene, sequencing of PCR products and phylogenetic analysis. Results showed that this protocol was set up properly and it was used for the identification of 26 isolates obtained from grapevines showing symptoms of black foot disease during the years 2014 and 2015. All isolates were identified as belonging to five different species: *Dactylonectria torresensis*, *D. alcacerensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma* e *Ilyonectria liriodendri*.

Key words: Black foot; *Dactylonectria*; *Ilyonectria*; *phylogenetic analysis*; PCR; *Vitis vinifera*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	7
2.1. Aislados fúngicos.	7
2.2. Preparación de cultivos monospóricos.	8
2.3. Extracción de DNA.	8
2.4. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).	9
2.5. Electroforesis en gel de agarosa.	10
2.6. Secuenciación.	10
2.7. Análisis filogenético.	11
3. RESULTADOS.	12
4. DISCUSIÓN.....	16
5. CONCLUSIONES.	19
6. BIBLIOGRAFÍA.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Aislados fúngicos estudiados.....	7
Tabla 2.2: Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR de los aislados.....	9
Tabla 3.1: Especies identificadas, aislados analizados y frecuencia de aparición.	12

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la histona H3, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los aislados utilizados son los indicados en la Tabla 2.1, y las secuencias adicionales corresponden a las secuencias de referencia, obtenidas de la base de datos del GenBank, de las especies *Dactylonectria torresensis* (JF735681), *D. alcacerensis* (JF735630), *D. novozelandica* (JF735633), *D. macrodidyma* (JF735647), *D. pauciseptata* (JF735587), *Ilyonectria liriodendri* (JF735508), *I. radicola* (JF735506), *I. pseudodestructans* (JF735563), *I. europea* (JF735567) e *I. lusitanica* (JF735570). Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis "bootstrap" de 1000 repeticiones. 14

Figura 3.2. Aspecto del anverso de cultivos monospóricos representativos crecidos en medio de cultivo PDA tras 15 días de incubación a 25 °C y oscuridad; A) *Dactylonectria macrodidyma*, B) *D. novozelandica*, C) *D. torresensis*, D) *D. alcacerensis*, E) y F) *Ilyonectria liriodendri*. 15

1. INTRODUCCIÓN.

Entre los distintos problemas fitosanitarios que pueden afectar al cultivo de la vid, en los últimos años han cobrado importancia las denominadas enfermedades de la madera de la vid (grapevine trunk diseases). Es a partir de la década de 1990 cuando se comienza a detectar un incremento de estas enfermedades en todo el mundo, principalmente en plantaciones jóvenes (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a). Dentro de la denominación de enfermedades de la madera de la vid se incluyen una serie de enfermedades causadas por hongos patógenos, que afectan a las partes leñosas de la planta (raíces, tronco y ramas) (Rubio y Garzón, 2011). En general, se puede afirmar que estas enfermedades dañan la madera de la planta, provocando su deterioro, lo que a menudo conlleva la muerte de partes de la planta o de toda ella, aunque esta muerte se produzca en un plazo de tiempo indeterminado. La incidencia de estas enfermedades se ha visto favorecida por diversos factores, entre los que se pueden citar cambios en las prácticas culturales y el manejo de los viñedos, baja calidad sanitaria del material de propagación, la prohibición en el uso del arsenito sódico, reemplazado por fungicidas menos efectivos, y una escasa protección de las heridas de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a).

Tradicionalmente, las enfermedades de la madera de la vid han sido asociadas con la viña adulta, siendo la yesca y la eutipiosis las principales alteraciones. Sin embargo, a finales del siglo pasado comenzó a detectarse un incremento general de la incidencia de estas enfermedades en todo el mundo, siendo especialmente graves en plantaciones nuevas (Agustí-Brisach *et al.*, 2014a). Este hecho provocó un aumento del interés por estas enfermedades, lo que desembocó en la descripción de nuevas patologías como la enfermedad de Petri o el decaimiento por Botryosphaeriaceae, y una mejora del conocimiento que se tenía de otras enfermedades como la enfermedad del pie negro (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach y Armengol, 2013).

La yesca es una de las enfermedades de la vid más antigua que se conocen y está considerada como endémica en todas las zonas vitivinícolas del mundo (Rubio y Garzón, 2011). La yesca afecta a plantas adultas. Los síntomas externos que produce en ellas pueden aparecer de dos formas: de una forma lenta o crónica, que se caracteriza por un deterioro gradual de la vegetación y de forma rápida o apopléjica, que se caracteriza por la muerte súbita de la planta. El síntoma interno más característico es la pudrición seca y esponjosa de color amarillento, debida a la degradación de la madera. En esta enfermedad intervienen dos tipos distintos de hongos patógenos: por una parte se encuentran los patógenos vasculares como *Phaeomoniella chlamydospora* y distintas especies de *Phaeoacremonium*, que actúan como patógenos primarios y, por otra parte, los basidiomicetos *Fomitiporia*

mediterranea y *Stereum hirsutum*, este último con menor frecuencia, que actúan como colonizadores secundarios (MAGRAMA, 2014).

La eutipiosis también afecta a plantas adultas y está causada por hongos de la familia Diatrypaceae, siendo *Eutypa lata* la especie más frecuente. Las plantas con eutipiosis presentan brotes débiles con entrenudos cortos, hojas más pequeñas y algo deformadas, cloróticas y con necrosis generalmente marginales. La madera afectada presenta en sección transversal una necrosis sectorial y de consistencia dura (MAGRAMA, 2014).

La enfermedad de Petri, también ha sido conocida como "black goo", "grapevine decline" o "young yesca", pero finalmente se denominó como "enfermedad de Petri" porque fue el italiano Lionello Petri quien en 1912 describió por primera vez la sintomatología típica de la enfermedad. Los síntomas externos más característicos son la reducción del desarrollo de la planta, acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas con clorosis internervial, tallos y ramas más pequeños y un decaimiento general que acaba con la muerte de la planta. Los síntomas internos suelen aparecer en la zona basal del portainjerto; allí, los hongos responsables colonizan los tejidos del xilema, lo que produce una necrosis de los vasos xilemáticos. Al realizar cortes transversales se observan pequeñas punteaduras (correspondientes a los vasos dañados). A veces también pueden observarse exudaciones gomosas. Está causada por hongos del género *Phaeoacremonium* y las especies *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*. Algunas de estas especies están incluidas en el conjunto de hongos asociados a la yesca y se cree que ambas enfermedades están estrechamente relacionadas. Sin embargo, la enfermedad de Petri ocurre principalmente en plantaciones jóvenes de menos de 5 años (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a; MAGRAMA, 2014)

El decaimiento por Botryosphaeriaceae, también conocido como "Botryosphaeria dieback" o "black dead arm", está causado por distintas especies de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae. Esta enfermedad suele afectar a plantas adultas, de más de 8 años, aunque también se han aislado hongos en plantas más jóvenes e incluso en plantas de vivero. En la madera se pueden observar necrosis sectoriales y de consistencia dura (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a; MAGRAMA, 2014)

El pie negro es una enfermedad grave en la mayoría de regiones vitivinícolas del mundo, principalmente en viveros y en plantaciones jóvenes, de entre dos y ocho años (Halleen *et al.*, 2006a). Fue descrita por primera vez en Francia en 1961 (Halleen *et al.*, 2006b), pero fue en la última década del siglo pasado cuando comenzó a incrementarse el número de casos y empezó a ser relevante (Gramaje y Armengol, 2011). En España el pie negro está citado desde el año 2000 (Agustí-Brisach y Armengol, 2014), afectando tanto a plantas de vivero como a plantas jóvenes.

El pie negro se caracteriza por dañar el sistema radicular y la base del patrón en plantas jóvenes. En las raíces se pueden observar lesiones oscuras, necróticas y deprimidas, que causan una reducción en la masa radicular (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b). 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 éstas más cercanas a la superficie del suelo (Alaniz *et al.*, 2009a). 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 (Alaniz *et al.*, 2009a). Las coloraciones oscuras y necrosis, principalmente en la base del portainjerto, son las que han dado a la enfermedad el nombre de pie negro (Alaniz *et al.*, 2007).

Los síntomas de la parte aérea se deben a los daños en las raíces y en la base del patrón. Como consecuencia de estos daños, las plantas infectadas presentan una reducción del desarrollo y menor vigor, ausencia o retraso de la brotación (de algunas yemas o incluso de la planta entera), acortamiento de entrenudos, clorosis en hojas y/o marchitez, y un decaimiento general que puede acabar con la muerte de la planta durante el período vegetativo o durante el invierno siguiente (Halleen *et al.*, 2006a; Agustí-Brisach y Armengol, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Los síntomas de la parte aérea podrían confundirse con otras enfermedades de la madera de la vid como la enfermedad de Petri. En este sentido, para un correcto diagnóstico es necesario proceder al arrancado de las plantas para observar el estado del sistema radicular y la base del patrón (Agustí-Brisach y Armengol, 2014).

Entre los agentes causales del pie negro de la vid se encuentran especies de distintos géneros: *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Ilyonectria* y *Dactylonectria* (Halleen *et al.*, 2006a; Agustí-Brisach y Armengol, 2014; Lombard *et al.*, 2014).

El género *Cylindrocarpon* fue descrito por primera vez en 1913 por Wollenweber (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). En 1966 Booth dividió el género *Cylindrocarpon* en cuatro grupos basándose en la presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas (Lombard *et al.*, 2014). Tradicionalmente el pie negro de la vid ha sido asociado a dos especies del género *Cylindrocarpon*: *C. destructans* y *C. obtusisporium* (Abreo *et al.*, 2010). *Cylindrocarpon destructans* fue descrita por primera vez afectando a vid en Francia en el año 1961 (Halleen *et al.*, 2006b), desde entonces, se ha identificado en Italia, Portugal, Argentina, Alemania, Nueva Zelanda y Sudáfrica, Brasil y California. Paralelamente, se citó la presencia de "*C. obtusisporium*" en Sicilia y luego en California (Agustí-Brisach y Armengol, 2013).

En el año 2004 fue descrita una nueva especie, *C. macrodidymum*, como agente causal de la enfermedad (Halleen *et al.*, 2004). En este mismo año también se describió un nuevo género asociado al pie negro, denominado *Campylocarpon*, en el que se incluyeron dos especies: *Campylocarpon fasciculare* y *Campyl. pseudofasciculare* (Agustí-Brisach y Armengol, 2014).

En 2006 los resultados de un trabajo donde se compararon aislados de *C. destructans* con otras especies de este género, revelaron que los aislados de *C. destructans* procedentes de vid presentaban secuencias idénticas a la especie *C. liriiodendri*, para los genes estudiados. Como consecuencia todos los aislados de *C. destructans* obtenidos de viña, fueron renombrados como *C. liriiodendri* (Halleen *et al.*, 2006b).

En 2011, Chaverri *et al.*, llevaron a cabo un estudio filogenético de *Neonectria*, *Cylindrocarpon* y las formas asexuales de *Cylindrocarpon*. Como consecuencia de los resultados de este estudio, el género *Neonectria* quedó dividido en 5 grupos: *Neonectria/Cylindrocarpon*, *Rugonectria*, *Thelonectria*, *Ilyonectria* y los anamorfos del género *Campylocarpon*. Tras esta reclasificación, las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* fueron incluidas dentro del género *Ilyonectria* y pasaron a denominarse como *I. liriodendri* e *I. macrodidyma*.

En 2012, análisis moleculares de diversos genes como el gen de la histona H3 o el gen de la β -tubulina, permitieron identificar varias especies nuevas dentro del género *Ilyonectria*, asociadas a la enfermedad del pie negro (Cabral *et al.*, 2012a). En 2014 un nuevo análisis multigenético de distintos aislados permitió identificar un nuevo grupo, *Dactylonectria*, que incluye especies previamente clasificadas dentro de *Ilyonectria* (Lombard *et al.*, 2014). Otro género que también se ha asociado al pie negro de la vid es *Cylindrocladiella*, destacando dos especies: *Cylindrocladiella parva* y *Cyl. peruviana* (Agustí-Brisach y Armengol, 2014).

Por todo esto se puede afirmar que los agentes causales de la enfermedad del pie negro son múltiples y diversos, y están en continua reevaluación taxonómica. Gracias a las técnicas moleculares se están identificando un número considerable de nuevas especies asociadas a esta patología, ya que la mayoría de ellas son indistinguibles sólo mediante la consideración de sus características fenotípicas. Para realizar este tipo de identificación es necesario tomar muestras del tejido enfermo de la planta y dejar que los hongos se desarrollen en el medio de cultivo adecuado durante varios días o semanas. Por tanto, este tipo de investigación es un proceso lento y que además necesita de un conocimiento experto sobre las especies a identificar debido a:

1. No todos los hongos que se desarrollan en la madera crecerán en el agar, y por tanto, estos no se podrán identificar.
2. En una sola muestra vegetal puede haber varias especies de hongos y esto puede llevar a confusión.
3. Si hay varios hongos distintos, éstos tendrán un ritmo de desarrollo diferente y la especie que se desarrolle más rápido crecerá por encima de las otras, lo que puede hacer que se pierda el resto de información.
4. La identificación de estas especies en base a características fenotípicas no es sencilla, debido a que los colores y la textura de la colonia, el tamaño de las conidias y la cantidad de esporas son variables y pueden existir diferencias entre aislados de la misma especie.

Por estas razones, en muchos casos la identificación de especies mediante características fenotípicas está siendo sustituida por técnicas moleculares que permiten la identificación de las especies de forma más fiable, sencilla y rápida. Para llevar a cabo un diagnóstico molecular se necesita realizar una extracción de DNA, una amplificación y una secuenciación, proceso que consume mucho menos tiempo que la identificación convencional (Alaniz *et al.*, 2009b; Gramaje y Armengol, 2011).

Los hongos causantes del pie negro son capaces de infectar a las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo (Agustí-Brisach *et al.*, 2014a). Estos hongos son habitantes comunes del suelo y se han realizado estudios que han demostrado que estos hongos están presentes en suelos de campos de vivero y también en viñedos comerciales (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b). Es más algunos de ellos producen estructuras de resistencia (clamidosporas) que les permiten sobrevivir durante largo tiempo en ausencia de hospedante. Por ello la fase de enraizamiento en los campos de vivero, así como el establecimiento de nuevas plantaciones, se consideran momentos críticos para la infección de plantas (Agustí-Brisach y Armengol, 2014). También se ha demostrado que las plantas madre podrían proporcionar el material vegetal de base infectado. Además los plántones pueden infectarse durante el proceso de producción de plántones injertados, debido a las heridas que se producen en algunas fases del mismo (Gramaje y Armengol, 2011).

Todo esto hace de la enfermedad del pie negro una de las enfermedades de la madera de la vid con mayor incidencia en planta joven en España en la actualidad (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a).

La comunidad de Castilla-La Mancha es una de las principales productoras de vino del país, contando con 463.912 hectáreas dedicadas a este cultivo, lo que supone un 48,8% de la superficie total de viñedo a nivel nacional. Desde el año 2002, las consultas relativas a plantas jóvenes de vid con síntomas de decaimiento han sido frecuentes en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). Un estudio realizado por el SEDAF que tenía como objetivo el diagnóstico de hongos de madera en muestras de vides plantadas a partir del año 2000, recibidas en el SEDAF en los años 2009 a 2013, reveló que las especies detectadas con mayor frecuencia fueron las de *Ilyonectria* (especies asociadas al pie negro). En un 80% de las 116 muestras analizadas se detectó *Ilyonectria* spp., y en un 25% de las mismas únicamente se detectó la presencia de *Ilyonectria* spp. Estas especies se detectaron fundamentalmente en las raíces y en la parte basal del portainjerto (Muñoz *et al.*, 2014).

Debido a la importancia que tiene el cultivo de la vid en Castilla-La Mancha, es fundamental disponer de los medios adecuados para detectar las posibles incidencias que pueden alterar el rendimiento del cultivo. En la mayoría de muestras de vid analizadas por el SEDAF, y que proceden de plantas con síntomas de decaimiento, las especies que se detectan con más frecuencia son las que están consideradas como agentes causales del pie negro. Este laboratorio realiza la identificación de estas especies basándose en características fenotípicas, sin embargo este sistema de detección no es el más adecuado debido a las dificultades e inconvenientes que presenta.

Por todo esto, el objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto en el laboratorio del SEDAF de un sistema de identificación molecular que permita identificar las especies causantes del pie negro de la vid. Para ello,

se propone utilizar este sistema para identificar una serie de aislados, procedentes de plantas de vid con síntomas de decaimiento, recogidos durante los años 2014 y 2015.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Aislados fúngicos.

El material de partida de este trabajo estaba constituido por 26 aislados fúngicos que presentaban esporulación como anamorfos similares a *Cylindrocarpon*, que previamente habían sido obtenidos de plantas de vid con síntomas de pie negro. Todas las muestras procedían de plantas de viñedos comerciales con edades comprendidas entre 1 y 10 años, recibidas en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del ITAP durante los años 2014 y 2015. Las muestras provenían de cuatro provincias y seis localidades distintas (Tabla 2.1). Estos aislados se encontraban conservados en medio de cultivo agar patata dextrosa (PDA).

Tabla 2.1: Aislados fúngicos estudiados.

Código	Año	Localidad	Provincia	Variedad / Patrón
cyl_1	2014	Jumilla	Murcia	-----
cyl_2	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_4	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_5	2014	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_6	2014	Jumilla	Murcia	-----
cyl_7	2014	Jumilla	Murcia	-----
cyl_8	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_11	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_12	2014	Jorquera	Albacete	Monastrell / 110R
cyl_13	2014	Jorquera	Albacete	Monastrell / 110R
cyl_14	2014	Jumilla	Murcia	-----
cyl_15	2014	Villanueva de la Jara	Cuenca	Garnacha tintorera / 110R
cyl_16	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_17	2014	Mahora	Albacete	Garnacha tintorera / 110R
cyl_19	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_20	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_21	2014	Villanueva de la Jara	Cuenca	Garnacha tintorera / 110R
cyl_22	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_23	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_26	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_27	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_29	2015	Tarazona de la Mancha	Albacete	Cabernet Sauvignon / 110R
cyl_30	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_33	2014	Mahora	Albacete	Garnacha tintorera / 110R
cyl_34	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103
cyl_35	2015	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Airén / Paulsen 1103

2.2. Preparación de cultivos monospóricos.

De cada uno de los aislados fúngicos se prepararon cultivos monospóricos. Un cultivo monospórico es aquel que procede de una única espora. La finalidad del establecimiento de este tipo de cultivo es asegurar la pureza genética de una muestra. Los cultivos iniciales de este proyecto habían sido obtenidos por aislamiento de plantas enfermas. Por tanto, se trataba de cultivos masales que podían contener información genética heterogénea, lo que habría podido suponer un problema para su secuenciación. Para ello, y siempre realizando todas las operaciones dentro de una campana de flujo laminar, se tomó una pequeña porción del aislado fúngico y se introdujo en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de agua destilada estéril. A continuación se agitó el tubo durante 15-20 segundos con un agitador vórtex, para liberar el mayor número de esporas posibles. Inmediatamente después se transfirieron 100 μ L de ese tubo a otro tubo que también contenía 1 mL de agua destilada estéril y se agitó en vórtex. Se repitió esta operación hasta llegar a una dilución 10^{-5} mediante diluciones seriadas.

Una vez realizadas las diluciones, se procedió a sembrar el contenido de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas con medio PDA con la adición de 0,5 g/L de sulfato de estreptomycin (PDAS). Para ello se agitó nuevamente cada tubo con un vórtex, se tomó 1 mL de la disolución y se extendió por la placa procurando que quedara lo más uniformemente repartido. A continuación las placas sembradas se dejaron abiertas en la campana de gases durante 1-2 horas para que se secan y así evitar la aparición de contaminación por bacterias. Pasado ese tiempo, las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 2-3 días.

De esta manera, de cada aislado fúngico inicial se obtuvieron cuatro placas de medio de cultivo PDAS que estaban sembradas con las distintas diluciones realizadas. Después se escogió una colonia que estuviera aislada de las demás, de entre todas las que habían aparecido en cada una de las cuatro placas de cada aislado y haciendo uso de un bisturí se transfirió la colonia seleccionada a una placa con medio PDA, tratando de situar la colonia en el centro de la placa y en contacto con el medio.

Por último, las placas con las nuevas colonias (cultivos monospóricos) se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 20-25 días.

2.3. Extracción de DNA.

El DNA genómico de todos los aislados se obtuvo de micelio y esporas de cada uno de los cultivos monospóricos realizados de cada aislado. De cada placa se tomó una pequeña porción de micelio, haciendo uso de una espátula, y esta fue introducida en un tubo de PCR que contenía 20 μ l de NaOH 25mM

a pH 12. El NaOH es utilizado para llevar a cabo la lisis alcalina de las células y para romper los puentes de hidrógeno contribuyendo así a la desnaturalización del DNA. Cada uno de estos tubos fue calentado a 100 °C durante 10 minutos y seguidamente se mantuvo a 4 °C durante 5 minutos. Tras esto se añadieron 40 µl de Tris-HCl 40mM a pH 5 para neutralizar el pH de la disolución.

2.4. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) es un procedimiento utilizado para sintetizar *in vitro* grandes cantidades de una región concreta de DNA. Las reacciones de PCR preparadas para cada muestra son de un volumen de 27 µl y constan de:

- Tampón de reacción 10x (comercial) 1mM. Volumen: 2,5 µl.
- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 0,8 mM. Volumen: 2,5 µl.
- Cloruro de magnesio (MgCl₂) 2,5 mM. Volumen: 2,5 µl.
- Cebadores (directo y reverso) 0,4 mM. Volumen: 1 µl.
- Agua destilada estéril. Volumen: 14,3 µl.
- DNA Polimerasa (Taq). 5 U/mL. Volumen: 0,2 µl.
- DNA genómico. Volumen: 3 µl.

La pareja de cebadores empleada (H3F y H3R) se utilizó para amplificar una región de unas 500 pares de bases correspondientes al gen de la histona H3 y cuyas secuencias se presentan en la tabla 2.2. Se ha comprobado que este gen permite diferenciar distintas especies de *Cylindrocarpon* (Cabral *et al.*, 2012b). Los cebadores fueron comprados a Applied Biosystems (Madrid, España). El resto de reactivos y la DNA polimerasa fueron comprados a Canvax Biotech (Córdoba, España).

Tabla 2.2: Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR de los aislados.

Nombre	Secuencia
H3F	5' AGGTCCACTGGTGGCAAG 3'
H3R	5' AGCTGGATGTCCTTGGACTG 3'

El programa de PCR utilizado para la amplificación consistió en un primer paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 50 segundos, correspondientes a los pasos de desnaturalización, anillamiento y amplificación respectivamente. Por último se realizó un ciclo de amplificación final a 72 °C durante 10 minutos.

2.5. Electroforesis en gel de agarosa.

Para analizar los fragmentos de DNA resultantes de la PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para preparar la agarosa se añadieron 5 gramos de agarosa (D1low) a 500 mL de tampón TBE 1x (para preparar esto se diluían 100 mL de tampón TBE 10x en 900 mL de agua). Posteriormente se calentaba la mezcla durante 2 minutos y se agitaba utilizando un agitador magnético, la mezcla volvía a ser calentada y agitada hasta conseguir la disolución de la misma.

A la hora de analizar las muestras se utilizaron geles de 40 pocillos. Para ello se vertió sobre el soporte adecuado la cantidad precisa de agarosa fundida, de manera que quedara un gel con un grosor cercano a los 0,5 cm, y se dejó enfriar en presencia del peine, que contaba con el número de pocillos adecuados, durante 35 minutos aproximadamente. Transcurrido ese tiempo se retiró el peine y el gel se colocó en la cubeta de electroforesis para cargar las muestras. Antes de cargar las muestras a estas se les añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga. Las electroforesis se corrieron durante 30 minutos a un voltaje de 130 V. Tras la electroforesis los geles fueron teñidos con la solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe (20.000x). Este compuesto es un análogo al bromuro de etidio. Para la tinción se sumergía el gel durante 15-20 minutos en TBE y se le añadía el producto de tinción a razón de 5 mL por cada 100 mL de TBE utilizado. Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron mediante comparación con el marcador de referencia (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder).

2.6. Secuenciación.

Tras comprobar el resultado de la amplificación por PCR mediante una electroforesis, aquellas muestras que habían sido amplificadas se secuenciaron en una dirección (Reverse). Para su secuenciación las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Se enviaron 10 µL de cada una de las muestras a una concentración de 50 ng/µL. También se enviaron alícuotas de los cebadores a 10 µM.

2.7. Análisis filogenético.

Los resultados de la secuenciación fueron editados con el programa informático Sequencher (Versión 5.0). La edición de las secuencias se debe a que durante el proceso de secuenciación suelen aparecer errores tanto al principio como al final de las secuencias lo que después puede reducir la calidad del alineamiento con las secuencias de referencia de la base de datos. Para la edición de las secuencias se trabajó sobre el cromatograma de las mismas, seleccionando en él las regiones de mayor calidad, en general se obtuvieron secuencias editadas de unas 350 pares de bases.

Tras la edición de las secuencias se realizó, mediante el programa informático MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0), un alineamiento múltiple tipo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), utilizando para esto las secuencias de los aislados y varias secuencias de referencia de especies asociadas al pie negro y que fueron obtenidas de la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos).

Con este mismo programa y a partir del alineamiento múltiple se calcularon las distancias genéticas con el modelo 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 construyó un árbol filogenético mediante el método de Maximum Likelihood y se evaluó la robustez estadística del mismo mediante un análisis de "bootstrap" de 1000 repeticiones.

3. RESULTADOS.

De cada uno de los 26 aislados monospóricos se realizó una extracción de DNA y, posteriormente, una amplificación utilizando los cebadores H3F y H3R, correspondientes a una región del gen de la histona H3. Éstos se amplificaron correctamente, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases y fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos de secuencias del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La comparación de estas secuencias con las secuencias de la base de datos reveló que los 26 aislados pertenecían a cinco especies distintas: *Dactylonectria torresensis*, *D. alcacerensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma* e *Ilyonectria liriodendri*. En la tabla 3.1 se recogen los distintos aislados clasificados por especie y se detalla la frecuencia con la que han sido detectados en el estudio.

Tabla 3.1: Especies identificadas, aislados analizados y frecuencia de detección.

Especies	Aislados	Frecuencia (%)
<i>Dactylonectria torresensis</i>	Cyl_1; Cyl_2; Cyl_6; Cyl_7; Cyl_14; Cyl_19; Cyl_20; Cyl_27; Cyl_29; Cyl_30; Cyl_35	42,31
<i>D. novozelandica</i>	Cyl_8; Cyl_15; Cyl_16; Cyl_21; Cyl_34	19,23
<i>D. alcacerensis</i>	Cyl_12; Cyl_13	7,69
<i>D. macrodidyma</i>	Cyl_17; Cyl_33	7,69
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	Cyl_4; Cyl_5; Cyl_11; Cyl_22; Cyl_23; Cyl_26	23,08

Se realizó un alineamiento múltiple (MUSCLE) de las secuencias de los aislados, las secuencias de referencia de las especies citadas y otras secuencias de referencia de especies asociadas al pie negro de la vid. A partir

de este alineamiento múltiple se construyó un árbol filogenético por el método de Maximum Likelihood. Las secuencias de los aislados se clasificaron en 5 grupos distintos.

En el árbol filogenético obtenido se pueden diferenciar dos clados consistentes (96%). En el primer clado las secuencias de los aislados se clasificaron en cuatro subclados. El primer subclado estaba formado por 11 muestras agrupadas (con un valor de "bootstrap" del 90%) junto a la secuencia de referencia correspondiente a la especie *Dactylonectria torresensis* (Accesión del GenBank: CBS129086). El segundo subclado incluía 2 secuencias agrupadas (con un valor de "bootstrap" del 63%) junto a la secuencia de referencia de la especie *D. alcacerensis* (Accesión del GenBank: CBS129087). El tercer subclado estaba constituido por 5 secuencias agrupadas (con un valor de "bootstrap" del 98%) junto a la secuencia de referencia de la especie *D. novozelandica* (Accesión del GenBank: CBS113552). El cuarto subclado estaba formado por 2 secuencias agrupadas (con un valor de "bootstrap" del 99%) junto a la secuencia de referencia de la especie *D. macrodidyma* (Accesión del GenBank: CBS112615). En el segundo clado, las secuencias de los aislados se agruparon en un único subclado, en total 6 secuencias fueron clasificadas (con un valor de "bootstrap" del 99%) junto a la secuencia de referencia de la especie *Ilyonectria liri dendri* (Accesión del GenBank: CBS117526). En la figura 3.1 se presenta el árbol filogenético obtenido.

Adicionalmente se realizaron fotografías a cada uno de los cultivos monospóricos, tras 15 días de crecimiento en medio de cultivo PDA e incubación a 25°C, y oscuridad para observar las características fenotípicas de cada uno de ellos e intentar esclarecer si éstas podían ser útiles para la identificación de las especies. En la Figura 3.2 se presentan fotografías del aspecto de aislados representativos de cada especie detectada.

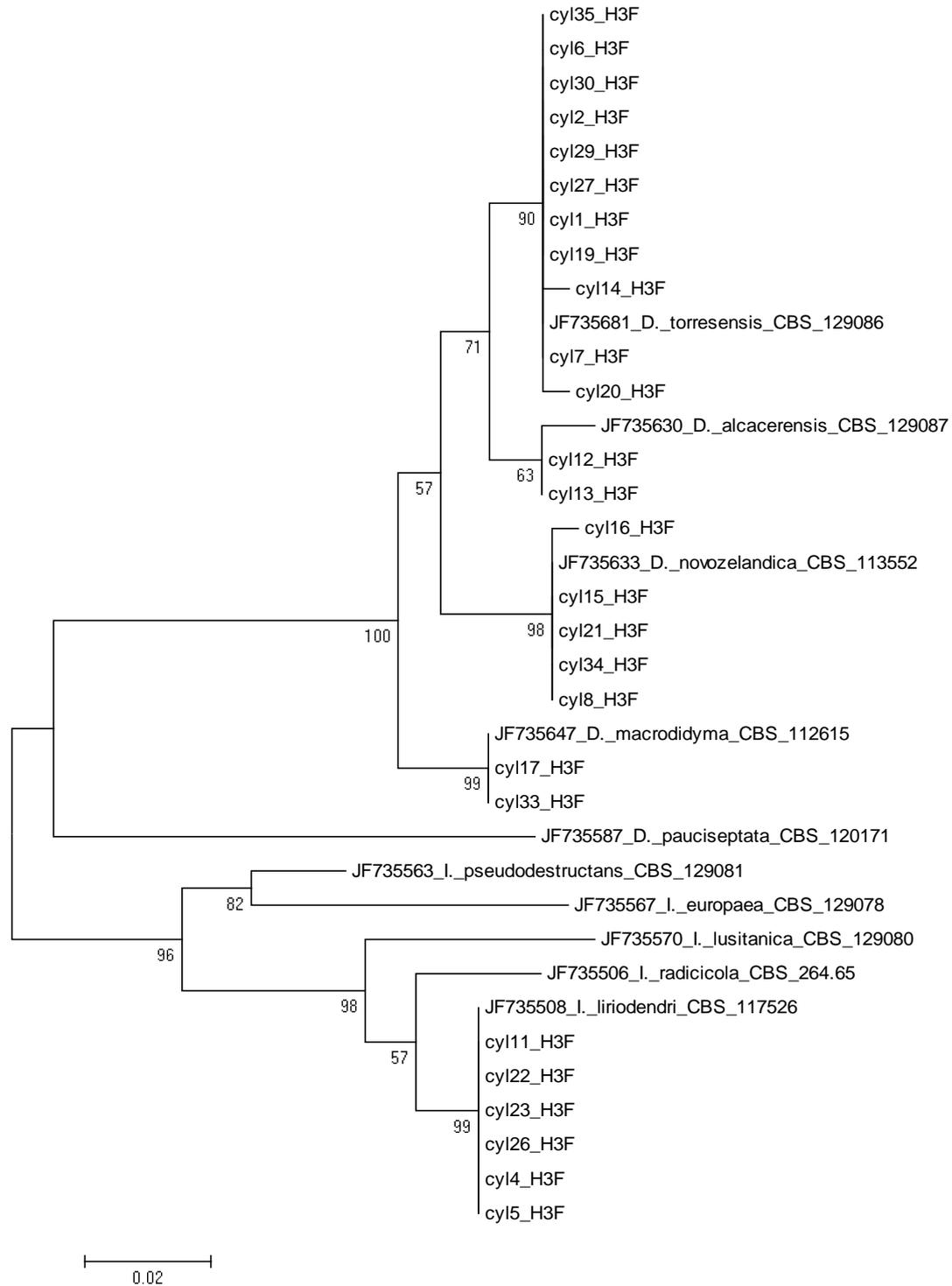


Figura 3.1. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la histona H3, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los aislados utilizados son los indicados en la Tabla 2.1, y las secuencias adicionales corresponden a las secuencias de referencia, obtenidas de la base de datos del GenBank, de las especies *Dactyloctenium torresensis* (JF735681), *D. alcacerensis* (JF735630), *D. novozelandica* (JF735633), *D. macrodidyma* (JF735647), *D. pauciseptata* (JF735587), *Ilyonectria liriodendri* (JF735508), *I. radiculicola* (JF735506), *I. pseudodestructans* (JF735563), *I. europea* (JF735567) e *I. lusitanica* (JF735570). Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis "bootstrap" de 1000 repeticiones.

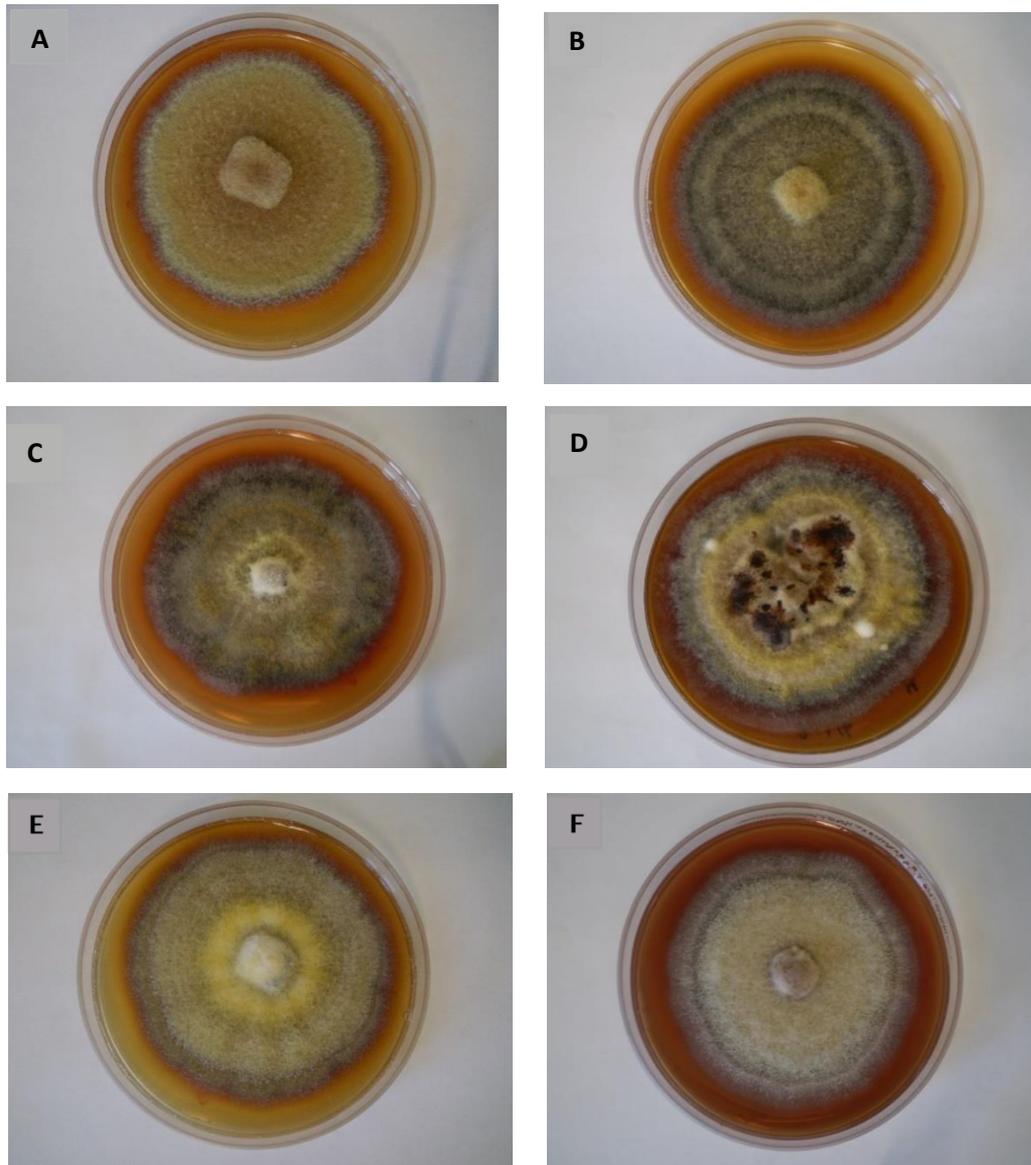


Figura 3.2. Aspecto del anverso de cultivos monospóricos representativos crecidos en medio de cultivo PDA tras 15 días de incubación a 25 °C y oscuridad; A) *Dactylonectria macrodidyma*, B) *D. novozelandica*, C) *D. torresensis*, D) *D. alcacerensis*, E) y F) *Ilyonectria liriodendri*.

4. DISCUSIÓN.

El objetivo de este trabajo era la puesta a punto de un sistema de detección molecular en el SEDAF, que permitiera la correcta identificación de las especies asociadas a la enfermedad del pie negro. Esta patología es una de las enfermedades de la madera de la vid más frecuente en planta joven en España y, especialmente en viñedos de Castilla La Mancha, provocando una elevada mortalidad de plantas durante los primeros años tras la plantación y graves pérdidas económicas para el sector (Lerma *et al.*, 2011).

Desde el año 2002, las consultas relativas a plantas jóvenes de vid con síntomas de decaimiento han sido frecuentes en el SEDAF y en la mayor parte de ellas las especies detectadas han sido las asociadas a la enfermedad del pie negro de la vid (Muñoz *et al.*, 2014). El sistema de identificación utilizado hasta el momento por este laboratorio se ha basado en caracteres morfológicos (aspecto de las colonias y de su esporulación). Sin embargo, este sistema de identificación no es el más recomendable, por los inconvenientes y problemas que presenta, ya que es un proceso lento y que requiere de un amplio conocimiento de los caracteres morfológicos diferenciales de las especies a identificar. En los últimos años el desarrollo de cebadores específicos o de las técnicas de secuenciación de ADN, han proporcionado una importante herramienta para la identificación de patógenos vegetales, convirtiendo actualmente a las técnicas moleculares en las más apropiadas para este fin (McCartney *et al.*, 2003).

Como puede apreciarse en las fotografías de las colonias de los aislados representativos de las especies identificadas, la caracterización fenotípica no es suficiente para determinar la especie concreta que se está estudiando. Todos los cultivos monospóricos obtenidos en este trabajo mostraron en su anverso una textura algodonosa y coloraciones blanquecinas, amarillentas, anaranjadas y de distintos tonos de marrón muy similares, lo que hizo que no fuese posible determinar a qué especie pertenecía cada aislado. Asimismo, tampoco el aspecto de las esporas y sus dimensiones permiten una distinción fácil entre especies pertenecientes a los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, debido a que se trata de géneros muy próximos genéticamente por lo que comparten gran cantidad de características morfológicas. Parece ser, que ambos géneros pueden distinguirse por la cantidad de clamidosporas que producen, ya que mientras que las especies clasificadas dentro del género *Ilyonectria* producen una cantidad abundante de clamidosporas, las especies del género *Dactylonectria* producen este tipo de estructuras en menor cantidad. Independientemente de esta característica, la diferenciación morfológica de ambos géneros resulta compleja, siendo todavía más complicada la distinción entre especies dentro del género (Lombard *et al.*, 2014).

La imposibilidad de identificar las especies a partir de caracteres morfológicos evidencia la necesidad de utilizar técnicas moleculares para este propósito. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, a partir del establecimiento de cultivos monospóricos, la extracción de DNA, la amplificación de este por PCR y su posterior secuenciación, se ha logrado la

correcta identificación de varias especies asociadas al pie negro de la vid. Para la amplificación se utilizaron los cebadores H3F y H3R, que amplifican una región del gen de la histona H3 de unas 500 pares de bases. Se utilizó este gen porque es el gen que ha demostrado tener mayor capacidad para diferenciar un mayor número de especies en los estudios multigenéticos realizados (Cabral *et al.*, 2012b).

Esta metodología de identificación molecular fue utilizada para estudiar una serie de aislados recogidos durante los años 2014 y 2015. Los resultados obtenidos muestran que los aislados analizados pueden identificarse como pertenecientes a cinco especies distintas: *Dactylonectria torresensis*, *D. alcacerensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma* e *Ilyonectria liriodendri*. Todas estas especies ya han sido citadas previamente en España afectando a vid (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b). De hecho, en el año 2005 las especies asociadas al pie negro de la vid encontradas con mayor frecuencia en nuestro país eran *Ilyonectria liriodendri* e *I. macrodidyma* (Alaniz *et al.*, 2007). Recientemente, mediante estudios multigenéticos se ha descubierto que dentro de *I. macrodidyma* existían polimorfismos. Como consecuencia de esto se describieron seis nuevas especies dentro del complejo *I. macrodidyma*, tres de esas especies, han sido detectadas en este estudio (*D. torresensis*, *D. alcacerensis* y *D. novozelandica*) (Cabral *et al.*, 2012a). La reciente descripción de nuevas especies indicaría que muy posiblemente la alta tasa de *I. macrodidyma* detectada en trabajos anteriores fuera debida a la detección de varias especies incluidas dentro del complejo de *I. macrodidyma* en esos momentos (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b). La especie *D. torresensis* fue la que se detectó con mayor frecuencia y en un mayor número de localidades distintas, estos datos coinciden con los obtenidos por Reis *et al.* (2013) quienes estudiaron la diversidad de especies asociadas a la enfermedad del pie negro en plantaciones de vid de Portugal, siendo también la especie *D. torresensis* la más frecuente en este país.

En cuanto a la distribución geográfica, la especie que se ha encontrado en un mayor número de localidades es *D. torresensis*, ya que se ha detectado esta especie en tres localidades distintas. *Dactylonectria novozelandica* e *I. liriodendri* fueron identificadas en dos localidades distintas. Por último las especies *D. alcacerensis* y *D. macrodidyma* fueron detectadas en una sola localidad. A la vista de estos datos no puede afirmarse que estas especies tengan mayor incidencia en una zona que en otra ya que las especies que aparecen en un mayor número de localidades son aquellas que han sido detectadas con mayor frecuencia mientras que las que han sido detectadas en menos localidades también han sido las que han aparecido con menor frecuencia en el estudio.

Los resultados obtenidos parecen indicar que es habitual que en una plantación de vid afectada por pie negro coexistan varias especies distintas asociadas con esta patología, ya que en aquellas parcelas donde se han analizado un mayor número de muestras, han sido las que mayor variedad de especies han presentado, mientras que en aquellas parcelas donde el número de muestras analizados ha sido menor se han detectado menos especies.

La enfermedad del pie negro está asociada a varias especies pertenecientes a distinto géneros. Conseguir una identificación rápida y precisa de ellas puede ser una herramienta esencial para el control y manejo de estas enfermedades por parte del viticultor. No todas las especies asociadas al pie negro de la vid muestran la misma virulencia. En un estudio realizado por Cabral *et al.* (2012c) se analizó la virulencia de distintas especies asociadas con esta patología mediante la comparación de los síntomas relacionados con la pérdida de vigor ocasionados por cada especie, los daños causados a las raíces y también teniendo en cuenta el porcentaje de reaslamiento de los distintos patógenos a partir de tejidos necrosados en las raíces. Atendiendo a los resultados de este estudio, las especies detectadas en nuestro estudio presentan una virulencia intermedia en vid, excepto *D. novozelandica* cuya virulencia en vid es baja.

Otra información relevante a considerar es que algunas especies asociadas al pie negro de la vid pueden afectar a otros hospedantes, en los que su virulencia suele ser distinta. Por ejemplo se ha estudiado la virulencia que presentan algunas de estas especies sobre el kiwi (*Actinidia chinensis* Planch.) (Erper *et al.*, 2013). Esta información es importante, principalmente a la hora de establecer una nueva plantación de vid en suelos cultivados previamente con otros cultivos o, al contrario, para nuevas plantaciones en suelos previamente cultivados con vid, para evitar los problemas de infección cruzada que puedan tener lugar.

Actualmente no se dispone de medidas de control que erradiquen estos hongos en plantaciones establecidas, lo que hace que las estrategias de prevención y vigilancia sean esenciales. Diversos estudios han comprobado que el suelo puede ser una fuente importante de inóculo de los hongos asociados al pie negro de la vid (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b; Agustí-Brisach y Armengol, 2014). En este sentido, es interesante valorar el papel que podría desempeñar el uso de plantas trampa para detectar la especie de hongo asociados al pie negro presentes en una parcela antes de la plantación, ya que son habitantes habituales del suelo y además son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ausencia de hospedante gracias a la producción de formas de resistencia (clamidosporas) (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b). El uso de plantas trampa podría servir para obtener aislados representativos del suelo en evaluación y proceder posteriormente a su identificación mediante las técnicas utilizadas en este estudio. No obstante, actualmente ya está disponible una metodología para la detección y cuantificación de algunas especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* en muestras de suelo mediante PCR cuantitativa (Agustí-Brisach *et al.*, 2014b).

5. CONCLUSIONES.

1. Se ha logrado establecer un método de identificación molecular de especies asociadas al pie negro en el laboratorio del SEDAF.
2. El uso de esta metodología con 26 aislados procedentes de viñedos comerciales con síntomas de decaimiento, recogidos durante los años 2014 y 2015, ha permitido identificar estos aislados como pertenecientes a cinco especies distintas: *Dactylonectria torresensis*, *D. alcacerensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma* e *Ilyonectria liriodendri*. Todas estas especies ya habían sido citadas previamente en España asociadas al pie negro de la vid.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L. y Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39, 446-452.

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

Agustí-Brisach C. y Armengol J. (2014). El pie negro de la vid: agentes causales, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España* 260, 32-35.

Agustí-Brisach C., García-Jiménez J., Armengol J. y Gramaje G. (2014b). Detección de hongos de la madera en viveros de vid y estrategias para su control. *Phytoma España* 260, 26-30.

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

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

Agustí-Brisach C., Mostert L. y Armengol J. (2014a). Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex nested PCR and quantitative PCR. *Plant Pathology* 63, 316-322.

Alaniz S., Armengol J., García-Jiménez J., Abad-Campos P., and León M. (2009a). A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Dis.* 93, 821-825.

Alaniz S., García-Jiménez J., Abad-Campos P. y Armengol J. (2009b). El pie negro de la vid causado por *Cylindrocarpon*. *Tierras de Castilla y León* 156, 120-125.

Alaniz S., León M., García-Jiménez J., Abad-Campos P. y Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91, 1187-1193.

Cabral A., Groenewald J.Z., Rego C., Oliveira H. y Crous P.W. (2012a). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radiculicola* species complex. *Mycological Progress* 11, 655-688.

Cabral A., Rego C., Crous P.W. y Oliveira H. (2012c). Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (2), 340-354.

Cabral A., Rego C., Nascimento T., Oliveira H., Groenewald J.Z. y Crous P.W. (2012b). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal biology* 116, 62-80.

Chaverri P., Salgado C., Hirooka Y., Rossman A.Y. y Samuels G.J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68, 57-78.

Erper I., Agustí-Brisach C., Tunali B. y Armengol J. (2013). Characterization of root rot disease of kiwifruit in the Black Sea region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 136, 291-300.

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

Halleen F., Fourie P.H. y Crous P.W. (2006a). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45, 55-67.

Halleen F., Schroers H.J., Groenewald J.Z. y Crous P.W. (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 H.J., Groenewald J.Z., Rego C., Oliveira H. y Crous P.W. (2006b). *Neonectria liriodendri* sp. Nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology* 55, 227-234.

Lerma M.L., Gramaje D., García-Jiménez J., Armengol J., Castillo P., Muñoz R.M. (2011). Estudio de la presencia de hongos de la madera y virus en material de plantación de vid. *Tierras* 179, 138-142.

Lombard L., van der Merwe N.A., Groenewald J.Z. y Crous P.W. (2014). Lineages in *Nectriaceae*: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 515-532.

McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A. y Ward E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59, 129-142.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2014). Guía gestión integrada de plagas uva de transformación. Hongos de la madera de la vid, 161-163.

Muñoz R. M., Lerma M. L. y Armengol J. (2014). Hongos de la madera de la vid detectados en plantaciones jóvenes con síntomas de decaimiento en Castilla La Mancha en el periodo 2009- 2013. Resúmenes del XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Lérida: 157.

Reis P., Cabral A., Nascimento T., Oliveira H. y Rego C. (2013). Diversity of *Ilyonectria* species in a young vineyard affected by black foot disease. *Phytopathologia Mediterranea* 52 (2), 335-346.

Rubio J.J. y Garzón E. (2011). Las enfermedades de madera de vid como amenaza para el sector vitivinícola. *WINETECH* 2, 18-21.

Úrbez-Torres J. R., Haag P., Bowen P., y O’Gorman D. T. (2014). Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with black foot disease of grapevine. *Plant Disease* 98, 456-468.