

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 <i>Cylindrocarpon liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i>	73
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

<i>Cylindrocarpon liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i>	93
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 <i>C. macrodidymum</i>	105
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 micelial 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

