

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VI

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	Pg.
-----------------------	-----

<b>CAPITULO 1- INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	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
<b>CAPITULO 2- OBJETIVOS</b> .....	31
<b>CAPITULO 3- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR y PATOGENICA DE <i>Cylindrocarpon</i> spp.</b> .....	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**

<b>EN <i>Cylindrocarpon liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> .....</b>	<b>73</b>
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**

<b><i>Cylindrocarpon liriodendri</i> y <i>C. macrodidymum</i> .....</b>	<b>93</b>
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***

<b>y <i>C. macrodidymum</i> .....</b>	<b>105</b>
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
<b>CAPITULO 7- DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>125</b>
<b>CAPITULO 8- CONCLUSIONES .....</b>	<b>133</b>
<b>CAPITULO 9- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Pg.

<b>Tabla 1.1.</b> Superficie cultivada y producción total de vid en el mundo año 2004 .....	6
<b>Tabla 1.2.</b> Superficie cultivada según destino y Comunidad Autónoma en España año 2004 .....	7
<b>Tabla 3.1.</b> Aislados de <i>Cylindrocarpon</i> spp. de vid estudiados .....	39
<b>Tabla 3.2.</b> Pares de cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones del genoma de <i>Cylindrocarpon</i> spp. para los estudios moleculares .....	46
<b>Tabla 3.3.</b> Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de <i>C. liriodendri</i> seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas .....	52
<b>Tabla 3.4.</b> Resultado de los cruzamientos entre los 10 aislados de <i>C. macrodidymum</i> seleccionados según diferentes orígenes geográficos y características fenotípicas .....	53
<b>Tabla 3.5.</b> Variables analizadas en los factores 1 y 2 extraídos del análisis factorial multivariante .....	54
<b>Tabla 3.6.</b> 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
<b>Tabla 3.7.</b> 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
<b>Tabla 3.8.</b> 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
<b>Tabla 3.9.</b> 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

<b>Tabla 4.1.</b> 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
<b>Tabla 4.2.</b> 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
<b>Tabla 4.3.</b> 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
<b>Tabla 6.1:</b> 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
<b>Tabla 6.2.</b> Valores de la Concentración Efectiva 50 (mg L <sup>-1</sup> 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
<b>Tabla 6.3.</b> 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.

<b>Figura 1.1.</b> 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
<b>Figura 3.1.</b> Aspecto del anverso de algunas de las colonias de <i>Cylindrocarpon</i> spp. crecidas en medio PDA .....	50
<b>Figura 3.2.</b> Aspecto de algunas de las estructuras de <i>Cylindrocarpon</i> spp. en colonias crecidas en medio PDA y en medio SNA .....	51
<b>Figura 3.3.</b> 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
<b>Figura 3.4.</b> Proyección de las variables analizadas según los dos factores seleccionados en el análisis estadístico multivariante .....	55
<b>Figura 3.5.</b> 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
<b>Figura 3.6.</b> Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores Dest1/Dest4.....	58
<b>Figura 3.7.</b> Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores BT1a/BT1b .....	59
<b>Figura 3.8.</b> Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la $\beta$ -tubulina (BT1), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura .....	60
<b>Figura 3.9.</b> Productos amplificados con la PCR utilizando los cebadores universales ITS1/ITS2 .....	61
<b>Figura 3.10.</b> 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
<b>Figura 3.11.</b> 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

<b>Figura 4.1.</b> 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) <sub>5</sub> , y B) cebador (CCA) <sub>5</sub> .....	83
<b>Figura 4.2.</b> 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) <sub>5</sub> y B) cebador (GT) <sub>7</sub> .....	84
<b>Figura 4.3.</b> 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
<b>Figura 4.4.</b> 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
<b>Figura 5.1.</b> Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc	101
<b>Figura 5.2.</b> Productos obtenidos con el protocolo de extracción de ARNdc antes y después de la digestión con la enzima DNAsa .....	102
<b>Figura 6.1.</b> 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
<b>Figura 6.2.</b> 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
<b>Figura 6.3.</b> 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
<b>Figura 6.4.</b> 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

