

TESIS DOCTORAL

“New insights into the biology, ecology and control of black-foot disease in grapevine”

DOCTORANDA: Carmen Berlanas Vicente

DIRECTORES: Dr. David Gramaje Pérez y el Dr. Enrique García-Escudero Domínguez

TUTOR: Ignacio Pérez Moreno

CENTRO DE TRABAJO: Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 2 de abril de 2020 mediante sistema de videoconferencia.

RESUMEN

Actualmente, las enfermedades fúngicas de la madera de la vid son muy graves y han sido señaladas en muchos foros como una de las principales preocupaciones actuales del sector vitivinícola, si no la mayor. Entre estas enfermedades destaca la enfermedad del pie negro, cuya incidencia es creciente en viveros de vid y en nuevas plantaciones. Esta enfermedad está causada por numerosas especies con formas asexuales del tipo “*Cylindrocarpon*”. El pie negro ha sido extensamente estudiado en España durante los últimos años. Sin embargo, la constante reclasificación y ampliación taxonómica de las especies asociadas a la enfermedad, la restricción en la aplicación de fungicidas y la emergencia en el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación ha hecho necesario una revisión y actualización de los conocimientos obtenidos hasta ahora. En esta tesis se ha estudiado en detalle la biología y ecología de la enfermedad, y se han evaluado diversas estrategias de control.

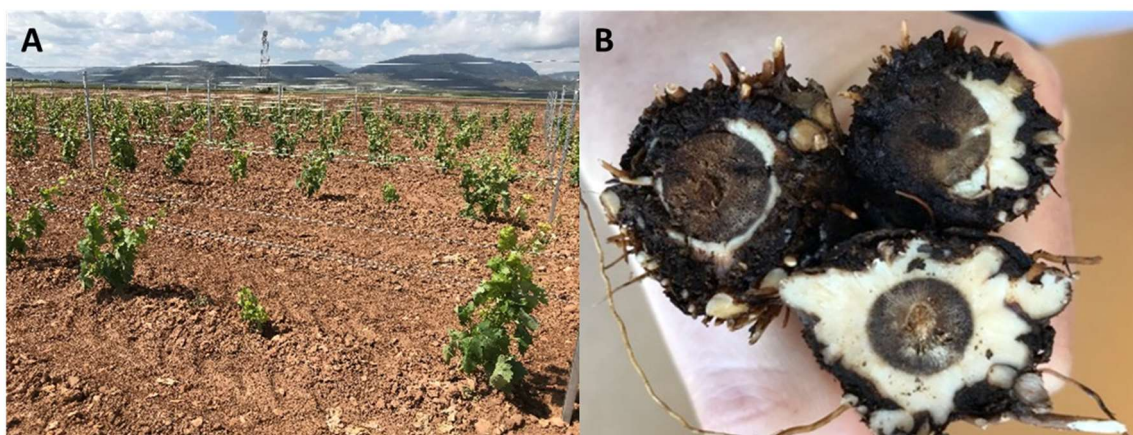


Figura 1. (A) Reducción del desarrollo en plantaciones jóvenes. (2) Necrosis en la parte basal del portainjerto causada por hongos asociados al pie negro de la vid.

En primer lugar, se caracterizó una amplia colección de aislados asociados al pie negro obtenidos de vides asintomáticas. Estos aislados fueron analizados mediante el estudio

de sus caracteres fenotípicos y la secuenciación de los genes *his3*, *tef1* y *tub2*, y la región ITS. Como resultado, se describieron dos nuevas especies asociadas al pie negro de la vid: *Dactylonectria riojana* e *Ilyonectria vivaria*, y por primera vez se aislaron de vid *Ilyonectria pseudodestructans* y *Neonectria quercicola*, elevando a 17 el total de especies fúngicas asociadas con la enfermedad en España. A continuación, se desarrolló un medio semi-selectivo para identificar y cuantificar propágulos viables de hongos asociados al pie negro en muestras de suelo. El uso de este medio permitió confirmar la presencia de inóculo en campos de vivero en rotación y en viñedos adultos. Además, se estableció una relación positiva entre Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de los patógenos de la enfermedad del pie negro y la concentración de CaCO_3 en el suelo.

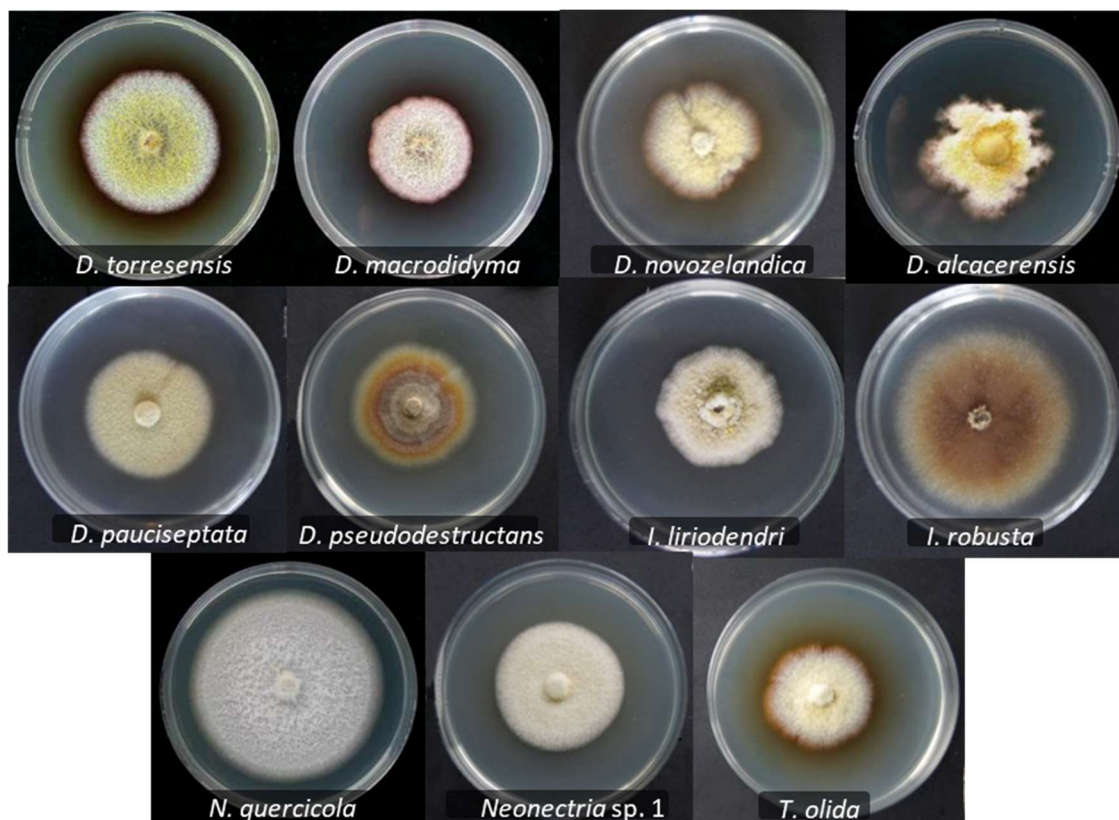


Figura 2. Especies con formas asexuales del tipo "*Cylindrocarpon*" aisladas de vides asintomáticas en España. *D* = *Dactylonectria*. *I* = *Ilyonectria*. *N* = *Neonectria*. *T* = *Telonectria*.



Figura 3. Conidios de *Dactylonectria riojana* (A y B). Conidióforo y clamidosporas de *Ilyonectria vivaria* (C y D).

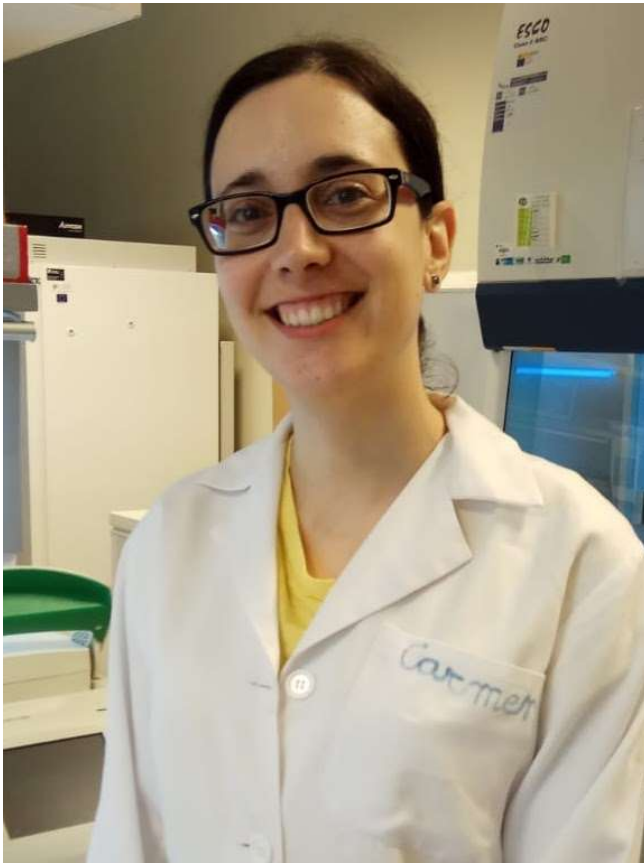
Por otro lado, se caracterizó el microbioma fúngico y bacteriano de la rizosfera de 5 portainjertos en dos viñedos localizados en La Rioja y Navarra mediante secuenciación de amplicones. Los resultados mostraron que el genotipo fue determinante en la selección del microbioma residente en la rizosfera en el viñedo adulto (25 años), mientras que este factor no influía en la selección del microbioma en el viñedo joven (7 años). Sin embargo, diversas especies bacterianas y fúngicas se encontraron en ambos viñedos, lo que demuestra la existencia de un microbioma conservado en el viñedo, independientemente de la región geográfica. Además, se observó una correlación positiva entre la abundancia relativa de patógenos de la enfermedad del pie negro obtenida mediante secuenciación masiva de amplicones y la obtenida mediante qPCR. La rizosfera de los portainjertos “140 R” y “161-49 C” contenían menor cantidad de estos patógenos que los portainjertos “1103 P”, “110 R” y “41 B”. Por último, en cuanto a medidas de control, se comparó la eficacia de la biofumigación con mostaza blanca (*Sinapis alba*) con la aplicación del fungicida propamocarb + fosetyl-Al y el producto comercial Tusal®, un agente de biocontrol basado en las especies *Trichoderma atroviride* T11 y *Trichoderma asperellum* T25. Los resultados mostraron que la biofumigación con *Sinapis alba* es una alternativa prometedora al uso de fungicidas químicos para el control de la enfermedad del pie negro, mientras que la aplicación de *Trichoderma* spp. en las raíces antes de la plantación resultó ser inefectiva para el manejo de la enfermedad.

Publicaciones derivadas de esta Tesis:

1. **Berlanas C**, Ojeda S, López-Manzanares B, Andrés-Sodupe M, Bujanda R, Martínez-Diz MP, Díaz-Losada E, Gramaje D (2020) Occurrence and diversity of black-foot disease fungi in symptomless grapevine nursery stock in Spain. **Plant Dis** 104:94-104.
2. **Berlanas C**, López-Manzanares B, Gramaje D (2017) Estimation of viable propagules of black-foot disease pathogens in grapevine cultivated soils and their relation to production systems and soil properties. **Plant Soil** 417:467-479.

3. **Berlanas C**, Berbegal M, Elena G, Laidani M, Cibriain JF, Sagüesa-Sara A, Gramaje D (2019) The fungal and bacterial rhizosphere microbiome associated with grapevine rootstock genotypes in mature and young vineyards. **Front Microbiol** 10:1142.

4. **Berlanas C**, Andrés-Sodupe M, López-Manzanares B, Maldonado-González MM, Gramaje D (2018) Effect of white mustard cover crop residue, soil chemical fumigation and *Trichoderma* spp. root treatment on black-foot disease control in grapevine. **Pest Manag Sci** 74:2864-2873.



Doctoranda: Carmen Berlanas Vicente