# ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

29

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 29 (2017). Logroño (España).
P. 1-200, ISSN: 1131-5423

**DIRECTORA**
Patricia Pérez Matute

**CONSEJO DE REDACCIÓN**
Luis Español González
Rubén Esteban Pérez
Rafael Francia Verde
Juana Hernández Hernández
Alfredo Martínez Ramírez
Luis Miguel Medrano Moreno
Ana María Palomar Urbina
Ignacio Pérez Moreno
Enrique Requeta Loza
Purificación Ruiz Flaño
Angélica Torices Hernández

**CONSEJO CIENTÍFICO**
José Antonio Arizaleta Urarte
(Instituto de Estudios Riojanos)
José Arnáez Vadillo
(Universidad de La Rioja)
Susana Caro Calatayud
(Instituto de Estudios Riojanos)
Eduardo Fernández Garbayo
(Universidad de La Rioja)
Rosario García Gómez
(Universidad de La Rioja)
José Mª García Ruiz
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Javier Guallar Otazua
(Universidad de La Rioja)
Teodoro Lasanta Martínez
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Joaquín Lasierra Cirujeda
(Hospital San Pedro, Logroño)
Luis Lopo Carramiñana
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)
Fernando Martínez de Toda
(Universidad de La Rioja)
Juan Pablo Martínez Rica
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
José Luis Nieto Amado
(Universidad de Zaragoza)
José Luis Peña Monné
(Universidad de Zaragoza)
Félix Pérez-Lorente
(Universidad de La Rioja)
Diego Troya Corcuera
(Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia, Estados Unidos)
Eduardo Viladés Juan
(Hospital San Pedro, Logroño)
Carlos Zaldívar Ezquerro
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

**DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN**
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26071 Logroño
publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €
Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €
Número suelto: 9 €
Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

# ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 29

## VID Y VINO

Coordinador:
IGNACIO PÉREZ MORENO

Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2017

Vid y vino / coordinador Ignacio Pérez Moreno. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2017
197 p. : gráf. ; 24 cm– (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 29).-
D.L. LR 413-2012

1. Vinos - España. I. Pérez Moreno, Ignacio. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie

634.8(460)
663.2(460)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse o transmitirse por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

© Logroño, 2017
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2.
26001-Logroño, La Rioja (España)

© Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación

© Cubierta y contracubierta: Colores rojizos de parra silvestre en un rincón del río Iregua (Fotografía de José Manuel Valle Melón)

Vid silvestre en la parcela experimental de la Universidad de La Rioja (Fotografía de Álvaro Rodríguez Miranda)

Imprime: Gráficas Isasa, S. L. - Arnedo (La Rioja)

ISSN 1131-5423
Depósito Legal LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

# ÍNDICE

**CARMEN BERLANAS, BEATRIZ LÓPEZ-MANZANARES, DAVID GRAMAJE**
Desarrollo de un medio de cultivo para detectar propágulos viables de hongos asociados a la enfermedad del pie negro en viñedos
*Estimation of viable propagules of black-foot disease pathogens in grapevine cultivated soils and their relation to production systems and soil properties* ..... 7-24

**MARÍA ÁNGELES DEL-CASTILLO-ALONSO, LAURA MONFORTE, GONZALO SORIANO, RAFAEL TOMÁS-LAS-HERAS, JAVIER MARTÍNEZ-ABAIGAR, ENCARNACIÓN NÚÑEZ-OLIVERA**
Diferencias en el perfil fenólico del hollejo entre dos variedades tintas de *vitis vinifera*, Tempranillo y Garnacha, y sus correspondientes variantes blancas
*Differences in the phenolic profile of berry skins among two red varieties of* vitis vinifera, *tempranillo and garnacha, and their corresponding white variants* ..... 25-40

**ESTEBAN GARCÍA RUIZ, VICENTE S. MARCO MANCEBÓN, IGNACIO PÉREZ MORENO**
Análisis geoestadístico de la distribución espacio-temporal de *Lobesia Botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) en Rioja Alta (España)
*Geostatistical analysis of space-time distribution of* Lobesia Botrana *(Lepidoptera: Tortricidae) in Rioja Alta (Spain)* ..... 41-66

**JUANA MARTÍNEZ, ANA GONZALO-DIAGO, ELISA BAROJA, ENRIQUE GARCÍA-ESCUDERO**
Características agronómicas y potencial enológico de las variedades de vid blancas autorizadas en la D.O.Ca. Rioja.
*Agronomic characteristics and enological potential of white vine varieties authorized in the D.O.Ca. Rioja* ..... 67-82

**FERNANDO MARTÍNEZ DE TODA FERNÁNDEZ, JESÚS GARCÍA MARTÍN, PEDRO BALDA**
Adaptación al calentamiento climático de veinte variedades de vid, minoritarias de la DOCa Rioja, por su potencial de acidez
*Adaptation to climate warming of twenty vine varieties, minorities in the DOCa Rioja, through their acidity potential* ..... 83-94

**FERNANDO MARTÍNEZ DE TODA FERNÁNDEZ, RAFAEL OCETE RUBIO, EDUARDO PRADO VILLAR, ÁLVARO RODRÍGUEZ MIRANDA, JOSÉ MANUEL VALLE MELÓN**
La vid silvestre en La Rioja (España): situación actual y difusión mediante infraestructuras de datos espaciales
*Wild grapevine in La Rioja, Spain: current situation and dissemination through spatial data infrastructures* ..... 95-120

**MAITE RODRÍGUEZ-LORENZO, CAROLINA ROYO, PABLO CARBONELL-BEJERANO, FÉLIX CIBRÍAIN SABALZA, JULIÁN SUBERVIOLA RIPA, ANA SAGÜÉS SARASA, JAVIER IBÁÑEZ, JOSÉ M. MARTÍNEZ ZAPATER**
Caracterización de deleciones causantes de cambios en el color de la uva mediante evaluación de la heterocigosidad de marcadores SNP
*Characterization of deletions responsible for grape berry color changes through the study of loss of heterozygosity of SNP markers*.....121-140

**JAVIER PORTU, ROSA LÓPEZ, PILAR SANTAMARÍA, TERESA GARDE CERDÁN**
Efecto de la aplicación foliar de jasmonato de metilo en la composición fenólica de la uva y del vino
*Effect of methyl jasmonate foliar application on the grape and wine phenolic composition*.....141-154

**PILAR RUBIO-BRETÓN, MATTEO BORDIGA, JUANA MARTÍNEZ, ANA GONZALO-DIAGO, EVA P. PÉREZ-ÁLVAREZ, TERESA GARDE-CERDÁN**
Envejecimiento de vinos en barricas y alternativos de roble
*Aging of wines in oak barrels and alternatives* .....155-176

**LUCÍA GONZÁLEZ-ARENZANA, PATROCINIO GARIJO, ANA ROSA GUTIÉRREZ, ROSA LÓPEZ, PILAR SANTAMARÍA, ISABEL LÓPEZ-ALFARO, CARMEN OLARTE, SUSANA SANZ**
Factores implicados en la alteración de vinos tintos por *Brettanomyces bruxellensis*
*Factors involved in the red wines spoilage produced by* Brettanomyces bruxelliensis.....177-194

Zubía. Monográfico 29 7-24 Logroño 2017

# DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA DETECTAR PROPÁGULOS VIABLES DE HONGOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DEL PIE NEGRO EN VIÑEDOS

**CARMEN BERLANAS[1]**
**BEATRIZ LÓPEZ-MANZANARES[1]**
**DAVID GRAMAJE[1]***

RESUMEN

En este estudio se comparó la eficacia de tres medios de cultivo para estimar la población de hongos asociados al pie negro en suelos y analizar el modo en que su distribución y abundancia varía en relación a determinados cambios en las propiedades del suelo. El medio Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba (GFBRBA) fue el más eficaz. Todos los suelos naturalmente infestados resultaron positivos a la presencia de hongos causantes del pie negro. *Dactylonectria torresensis* fue la especie más frecuente. La concentración de carbonato de calcio en el suelo se correlacionó positivamente con la presencia de unidades formadoras de colonias (CFUs). En este estudio se ha desarrollado un método específico, preciso y rápido para detectar propágulos viables de hongos asociados a la enfermedad del pie negro en el suelo, lo cual es crucial para entender la ecología de estos patógenos y poder así diseñar estrategias efectivas de control.

Palabras clave: Dactylonectria torresensis, *ecología fúngica, enfermedad de la madera de la vid, inóculo del suelo*.

*The accuracy and efficiency of three culture media protocols for estimating black-foot disease pathogens populations in soils was assessed and to examine how shifts in the abundance and composition of black-foot pathogens correspond to changes in specific soil properties were examined. Glucose-faba bean rose bengal agar media (GFBRBA) was selected as the most efficient culture medium. All naturally infested soils tested positive for the presence of black-foot pathogens. Dactylonectria torresensis was the most frequently isolated species. A positive relationship between calcium carbonate and the Colony-Forming Units (CFUs) level of black-foot pathogens in soil was obtained. In this study, we provide an early, specific, and accurate de-*

1. Servicio de Investigación Vitivinícola. Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad de La Rioja – Gobierno de La Rioja, Ctra. LO-20 Salida 13, Finca La Grajera, 26071 Logroño, España.

* Autor de referencia (*corresponding author*): david.gramaje@icvv.es.

*tection of viable propagules of black-foot pathogens in soil, which is critical to understand the ecology of these fungi and to design effective management strategies.*

Keywords: Dactylonectria torresensis*, fungal ecology, grapevine trunk disease, soilborne inoculum.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del pie negro es una de las principales enfermedades causadas por hongos del suelo que afectan a la vid en todo el mundo. Esta enfermedad tiene una gran incidencia en viveros y nuevas plantaciones, causando el síndrome denominado como decaimiento de vid joven ("Young vine decline") (Halleen *et al.*, 2006; Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach y Armengol, 2013). Las plantas de vid afectadas por el pie negro presentan un retraso en su desarrollo, con una vegetación débil, hojas cloróticas y achaparradas por la falta de agua y entrenudos más cortos (Figura 1a). En ocasiones, algunas yemas o la planta entera no llegan ni a brotar. Estos síntomas aéreos son consecuencia de los daños sufridos en las raíces y cuello de la planta, que es dónde ocurre la infección. Asimismo, estos síntomas son muy generales y pueden fácilmente confundirse con los producidos por la enfermedad de Petri. Las raíces de las plantas afectadas presentan lesiones oscuras, necróticas y deprimidas con la consiguiente reducción de la biomasa radicular (Figura 1b) (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). 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 más cercana a la superficie del suelo. 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 (Figura 1c y d) (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). Estos síntomas pueden, finalmente, conducir a la muerte de la planta en la misma campaña o en las campañas siguientes, ocurriendo más rápidamente cuanto más joven es la planta afectada (Agustí-Brisach y Armengol, 2013).

Varias especies de hongos pertenecientes a los géneros *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella, Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* y *Thelonectria* han sido asociadas a la enfermedad del pie negro (Agustí-Brisach y Armengol, 2013; Lombard *et al.*, 2014; Carlucci *et al.,* 2017), siendo *Dactylonectria torresensis* la especie más frecuente aislada de vides con síntomas de la enfermedad en España (Tolosa-Almentros *et al.*, 2016), Italia (Carlucci *et al.*, 2017) y Portugal (Reis *et al.*, 2013).

Las especies asociadas al pie negro de la vid son habitantes comunes en el suelo. La producción de esporas de resistencia (clamidosporas) les permite sobrevivir largos periodos de tiempo en ausencia de huéspedes (Petit *et al.*, 2011). Los patógenos infectan las plantas a través de aberturas

naturales o heridas, como la parte basal del portainjerto sin una completa formación del callo. La infección también puede ocurrir a través de heridas en los tallos, como las que se provocan al espergurar, a partir de las cuales la infección progresa hacia la base del tronco (Halleen *et al.*, 2006). Puesto que los hongos asociados a la enfermedad del pie negro se aíslan frecuentemente durante el proceso de producción de planta injerto en viveros (Hallen *et al.*, 2003, 2007; Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2013), así como en suelo del viñedo (Agustí-Brisach *et al.*, 2013b, 2014), se han planteado diferentes hipótesis sobre las fuentes de inóculo y su modo de propagación.

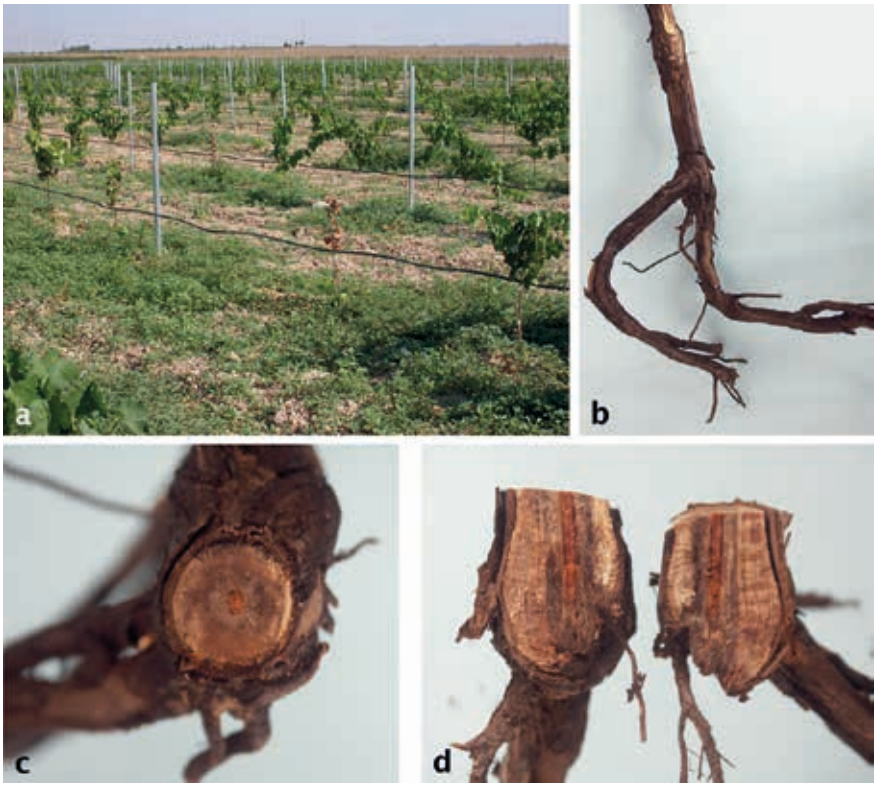


Fig. 1. (a) Plantas de vid afectadas por el pie negro: retraso en el desarrollo, vegetación débil, desecación y muerte. (b) Reducción de la masa radicular en plantas afectadas. Corte transversal (c) y longitudinal (d) de una planta joven de vid afectada por pie negro; obsérvese la necrosis generalizada de la madera del portainjerto.

La detección, identificación y cuantificación de patógenos asociados al pie negro a partir de muestras de suelo se ha centrado principalmente en el uso de técnicas moleculares basadas en la extracción de ADN (Damm y Fourie, 2005; Probst *et al.,* 2010; Cardoso *et al.*, 2013; Agustí-Brisach *et al.*,

2014). Sin embargo, aunque estos métodos son útiles, no hay que olvidar que la mera presencia de ADN no indica que el propágulo fúngico sea viable (England *et al.*, 1997; Demanèche *et al.*, 2001).

El uso de métodos tradicionales para identificar hongos patógenos en suelo no es sencillo. Estos métodos se basan principalmente en la técnica de diluciones sucesivas junto con el empleo de medios semi-selectivos y microscopía para identificar las estructuras que producen los hongos. La ventaja de estas técnicas es su simplicidad y bajo coste, lo que ha permitido su uso en diversas áreas y estudios (Elmholt *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2001; Cabello y Arambarri, 2002). Por el contrario, la mayor desventaja de las investigaciones que emplean el cultivo de los hongos es que la diversidad fúngica en el suelo puede ser bastante elevada, y el procesado de los cultivos puede ser largo cuando se maneja un gran número de aislados. Además, existe el riesgo de contaminación y que los hongos de crecimiento más rápido cubran toda la superficie de la placa de cultivo (Jeewon y Hyde, 2007), evitando de esta forma la detección temprana del organismo diana. Finalmente, hay especies que aun siendo diferentes tienen un comportamiento y morfología similar en el medio de cultivo.

El desarrollo de un medio para la detección de propágulos viables de hongos asociados a la enfermedad del pie negro permitiría: (i) mejorar el conocimiento sobre su ecología, (ii) alertar a viveros y viticultores ante la presencia de estos patógenos en suelo, (iii) establecer un nivel de riesgo de infección para la toma de decisiones sobre el momento óptimo de aplicación de estrategias de control, (iv) caracterizar la diversidad, estructura genética y patogenicidad de las poblaciones de hongos asociados al pie negro en suelo y comparar dichos resultados con aquellos obtenidos a partir de poblaciones aisladas de las raíces de vid y otros huéspedes secundarios (cultivos rotacionales en viveros y malas hierbas), y (v) comparar los resultados obtenidos empleando diferentes tipos de suelo y con aquellos obtenidos mediante la aplicación de técnicas moleculares de cuantificación (Probst *et al.*, 2010; Agustí-Brisach *et al.*, 2014).

Los objetivos de este estudio fueron: (i) adaptar y comparar medios de cultivo ya descritos para la detección de hongos del suelo relacionados filogenéticamente con aquellos causantes de la enfermedad del pie negro, (ii) evaluar la utilidad del medio más eficaz para estimar la población de hongos asociados al pie negro en suelos naturales, y (iii) estudiar cómo las variaciones en la abundancia y composición de sus poblaciones se relacionan con cambios en determinadas propiedades fisicoquímicas del suelo.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Preparación de los medios de cultivo

Se compararon tres medios de cultivo para determinar su eficacia en relación al crecimiento de varios patógenos asociados al pie negro y al ais-

lamiento de *Dactylonectria torresensis* de suelo estéril y natural. Los medios evaluados fueron: (i) Agar Rosa de Bengala Modificado (MRBA) y adaptado del medio descrito por Reedler *et al*. (2003), (ii) Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba (GFBRBA) modificado a partir del trabajo publicado por Hunter *et al*. (1980) y (iii) Agar con Glucosa e infusión de Haba (GFBA) modificado a partir del trabajo publicado por Singleton *et al*. (1993). En todos los medios se añadieron fungicidas y antibióticos (Tabla 1).

**Tabla 1. Composición de los medios de cultivo comparados**

| **MRBA (Reedler *et al*., 2002)[a]** | | **GFBRBA (adaptado de Hunter *et al*. 1980)[a]** | | **GFBA (adaptado de Singleton *et al*., 1993)[a]** | |
|---|---|---|---|---|---|
| Agar Rosa de Bengala (Difco) | 32 g | Habas, infusión | 62,5 g | Habas, infusión | 62,5 g |
| Peptona bacteriológica | 5 g | Agar Rosa de Bengala (Difco) | 32 g | Agar bacteriológico | 15 g |
| Dextrosa | 10 g | Peptona bacteriológica | 5 g | Glucosa | 100 g |
| KH2PO4 | 1 g | Dextrosa | 10 g | Cloranfenicol | 50 mg |
| MgSO4 7H2O | 500 mg | KH2PO4 | 1 g | Rifampicina | 10 mg |
| Agar bacteriológico | 15 g | MgSO4 7H2O | 500 mg | Estreptomicina | 30 mg |
| Rifampicina | 10 mg | Agar bacteriológico | 15 g | Ampicilina | 250 mg |
| Estreptomicina | 30 mg | Glucosa | 90 g | Agua destilada | 1 L |
| Ampicilina | 250 mg | Cloranfenicol | 50 mg | | |
| Pentacloro-nitrobenzeno | 500 mg | Rifampicina | 10 mg | | |
| Dicloran | 500 mg | Estreptomicina | 30 mg | | |
| Agua destilada | 1 L | Ampicilina | 250 mg | | |
| | | Agua destilada | 1 L | | |

[a] MRBA: Agar Rosa de Bengala Modificado; GFRBA: Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba; GFBA: Agar con Glucosa e infusión de Haba.

## 2.2. Evaluación del crecimiento micelial

Siete aislados de hongos asociados a la enfermedad del pie negro, así como un aislado de *Fusarium oxysporum* y otro de *Rhizoctonia solani* (hongos habituales del suelo) se sembraron en tres placas de los distintos medios e incubaron a 25 °C durante 10 días. Tras la incubación, se midieron dos diámetros perpendiculares del micelio por cada placa de los distintos hongos (Tabla 2). El experimento se realizó por duplicado, obteniéndose la media de 6 replicados para cada hongo y medio.

**Tabla 2. Crecimiento radial en mm (media±e.s.) en los diferentes medios de cultivo de los aislados fúngicos utilizados**

| Especie | Aislado | Año | Localización | Huésped | Crecimiento radial en MRBA[a] | Crecimiento radial en GFBRBA[a] | Crecimiento radial en GFBA[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Campylocarpon fasciculare* | GIHF-102 | 2015 | Aielo de Malferit (Valencia) | Portainjerto de vid 110 Richter | 23,2±0,6 b B | 26,7±0,6 b A | 45,0±0,7 a BC |
| *Dactylonectria alcacerensis* | DA-1 | 2016 | Aielo de Malferit (Valencia) | Portainjerto de vid 110 Richter | 17,7±0,2 c D | 24,2±0,2 b B | 46,2±0,5 a B |
| *D. macrodidyma* | 057 | 2016 | Aielo de Malferit (Valencia) | Portainjerto de vid 110 Richter | 15,2±0,2 c E | 26,5±0,2 b A | 41,2±0,3 a D |
| *D. novozelandica* | 058 | 2016 | Aielo de Malferit (Valencia) | Portainjerto de vid 110 Richter | 23,7±0,6 b B | 24,5±1,1 b B | 38,7±0,5 a E |
| *D. pauciseptata* | GIHF-100 | 2016 | Madrid | Common box | 19,5±0,7 b C | 21,7±0,3 b C | 41,2±0,5 a D |
| *D. torresensis* | BV-149 | 2015 | Mendavia (Navarra) | Portainjerto de vid 110 Richter | 16,7 ±0,0 c D | 20,7±0,3 b C | 38,5±0,2 a E |
| *Ilyonectria liriodendri* | IL-1 | 2016 | Aielo de Malferit (Valencia) | Portainjerto de vid 110 Richter | 24,0±0,2 c B | 26,5±0,9 b A | 43,7±0,4 a C |
| *Fusarium oxysporum* | GIHF-125 | 2016 | El Perelló (Valencia) | Tomate | 26,2±0,5 c A | 28,2±0,5 b A | 72,0±0,7 a A |
| *Rhizoctonia solani* | GIHF-140 | 2016 | Calasparra (Murcia) | Espinaca | 25,5±0,2 c A | 28,0±0,2 b A | 72,0±0,1 a A |

[a]MRBA: Agar Rosa de Bengala Modificado; GFRBA: Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba; GFBA: Agar con Glucosa e infusión de Haba.
Dentro de la misma columna, medias seguidas de distinta letra mayúscula son significativamente diferentes (P<0,005). Dentro de la misma fila, medias seguidas de distinta letra minúscula son significativamente diferentes (P<0,05).

## 2.3. Preparación de suelos artificialmente inoculados y aislamiento de *Dactylonectria torresensis*

Se recogieron muestras de suelo de un viñedo de 10 años de edad situado en la finca institucional de La Grajera (Logroño). Las muestras se tamizaron y secaron, y la mitad se esterilizó mediante doble autoclavado a 121ºC durante 1 hora durante dos días consecutivos. Por otro lado, se inocularon granos de trigo con la especie fúngica *D. torresensis*. Posteriormente, 10 gramos de las muestras de suelo, tanto la esterilizada como la natural, se mezclaron con 10 gramos de granos de trigo inoculados. Se diluyeron y homogeneizaron 20 gramos de la mezcla en 100 ml de agar agua al 0.1% agitándose durante 10 minutos a 250 rpm. Se diluyeron alícuotas de 1 ml 100 veces en 100 ml de agar agua al 0,1% (dilución 2) y posteriormente se diluyeron 10 veces en 9 ml de agua destilada (dilución 3). Las diferentes di-

luciones se sembraron en las placas de agar. Estas placas se incubaron a 25 °C durante 10 días, observando diariamente el crecimiento de colonias de *D. torresensis*. Posteriormente, el número de colonias se transformó a unidades formadoras de colonias (CFUs) por gramo de suelo. Para esta transformación se empleó la media de tres replicados (9 placas por replicado)

## 2.4. Detección de patógenos asociados a la enfermedad del pie negro en suelos infestados de forma natural

En junio de 2016, se recogieron muestras de suelo de ocho parcelas ubicadas en diferentes regiones de España: 4 viñedos establecidos (A, B, C y D), 2 viveros (E y F) y 2 parcelas en barbecho (G y H) (Tabla 3). Para ello, en cada parcela se marcó un área en forma de "V" que incluía cuatro espacios entre filas, de los cuales se tomaron cuatro muestras de suelo con una pala a una profundidad de 10-30 cm (0,5 kg de suelo por muestra). Se estudiaron y determinaron las propiedades fisicoquímicas de cada suelo en el Laboratorio Regional de la Comunidad Autónoma de La Rioja (Logroño). Las muestras de suelo se diluyeron y sembraron en GFBRBA (el medio elegido como el más eficaz). Las colonias desarrolladas se repicaron en medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (PDA) para su identificación morfológica y molecular.

**Tabla 3. Denominación y localización de las parcelas empleadas para el muestreo de suelo**

| Código | Origen geográfico | | Características de la parcela |
|---|---|---|---|
| | Localidad | Provincia | |
| A | Aldeanueva del Ebro | La Rioja | Viñedo de 27 años (Tempranillo / 110 Richter) |
| B | Olite | Navarra | Viñedo de 7 años (diferentes combinaciones de portainjerto/variedad) |
| C | Logroño | La Rioja | Viñedo de 10 años (Tempranillo / 110 Richter) |
| D | Logroño | La Rioja | Viñedo de 2 años (Tempranillo / 110 Richter) |
| E | Canals | Valencia | Parcela de vivero (Tempranillo / 110 Richter) |
| F | Canals | Valencia | Parcela de vivero (Tempranillo / 110 Richter) |
| G | Mendavia | Navarra | Parcela de vivero durante el tercer año de rotación (barbecho) |
| H | Canals | Valencia | Parcela de vivero durante el primer año de rotación (barbecho con maleza) |

## 2.5. Identificación fúngica

Los aislados fúngicos que, de acuerdo con el aspecto de sus colonias, parecían posibles hongos asociados a la enfermedad del pie negro se identificaron por sus características morfológicas. Además, la identidad de

estos aislados se confirmó mediante la aplicación de técnicas de biología molecular. En primer lugar, se realizó una extracción de ADN genómico de todos los aislados fúngicos a partir de micelio y esporas de colonias crecidas durante dos semanas en placas con medio PDA a 25ºC en oscuridad. A continuación, se secuenció mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región universal ITS (espaciadores transcritos internos) presente en todos los hongos, y en aquellos aislados que resultaron ser especies causantes de la enfermedad del pie negro se amplificó una secuencia parcial del gen de la histona para confirmar dicha identificación.

### 2.6. Análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Se estudiaron las siguientes propiedades del suelo: pH, conductividad eléctrica (CE), materia sólida orgánica (MSO), textura, carbonato total, capacidad de intercambio de cationes (CIC), calcio asimilable, magnesio asimilable, azufre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio y sodio en cuatro replicas por parcela. Los análisis se realizaron en el Laboratorio Regional de la Comunidad Autónoma de La Rioja (Logroño, La Rioja).

### 2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos de evaluación de los medios de cultivo y el crecimiento miceliar se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA utilizando el programa Statistix 10. Los valores de las medias del crecimiento miceliar y las CFUs se separaron mediante el test de diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación $\alpha = 0{,}05$.

Para agrupar los distintos suelos de acuerdo a sus propiedades físicoquímicas, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) con R versión 3.3.2 (The R Foundation for Statistical Computing) (R Core Team 2016). Además, se aplicó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para buscar correlaciones entre las CFUs y las propiedades físicoquímicas de los suelos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento micelial

Los tres medios de cultivo afectaron a la velocidad de crecimiento de los distintos hongos, siendo el medio MRBA en el que se observó un crecimiento menor de éstos en casi todos los casos, mientras que en el medio GBFA los diámetros de los hongos alcanzaron el mayor tamaño. Además, en aquellos medios que contenían agar rosa de bengala (MRBA y GFBRBA), se

observó que los hongos asociados a pie negro presentaban en la mayoría de los casos un pigmento amarillo que facilitaba su identificación.

### 3.2. Detección de *Dactylonectria torresensis* en suelos inoculados artificialmente

El número de colonias aisladas de *D. torresensis* varió en función del medio empleado (Tabla 4). En cuanto al suelo estéril inoculado, en la dilución 2, las CFUs aisladas por gramo de suelo en los medios GFBRBA y GFBA fueron significativamente mayores que en el medio MRBA. Sin embargo en la dilución 3, tan solo en el medio GFBRBA se aislaron un mayor número de CFUs. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en las muestras de suelo no estéril para la dilución 2, pero para la dilución 3 de nuevo los medios GFBRBA y GFBA presentaron un mayor número de CFUs.

**Tabla 4. Eficiencia media de recuperación de *Dactylonectria torresensis* (CFU/gr suelo) utilizando los medios MRBA, GFBRBA y GFBA en suelos estériles y no estériles inoculados artificialmente**

| | Suelo estéril | | Suelo no estéril | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilución 2 | Dilución 3 | Dilución 2 | Dilución 3 |
| Medio[a] | CFU/gr suelo (media±e.s.) | CFU/gr suelo (media±e.s.) | CFU/gr suelo (media±e.s.) | CFU/gr suelo (media±e.s.) |
| MRBA | 7407,4 ± 79,1 b | 1538,5 ± 148,1 b | 8592,6 ± 1002,3 a | 1481,5 ± 148,1 b |
| GFBRBA | 9037,0 ± 120,4 a | 4444,4 ± 326,2 a | 8740,7 ± 1328,2 a | 1538,5 ± 148,1 a |
| GFBA | 9185,2 ± 135,1 a | 1481,5 ± 148,1 b | 8888,9 ± 1405,4 a | 1538,5 ± 148,1 a |

[a]MRBA: Agar Rosa de Bengala Modificado; GFRBA Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba; GFBA: Agar con Glucosa e infusión de Haba.
Dentro de la misma columna, medias seguidas de distinta letra son significativamente diferentes (P<0,005).

### 3.3. Detección de patógenos asociados a pie negro en suelos naturales

Todos los suelos resultaron positivos a la presencia de patógenos asociados al pie negro, hallándose *D. torresensis* en todas las muestras (Fig. 2). Los resultados se presentan como el valor medio de 48 placas por cuatro muestras de suelo por parcela. Se encontraron diferencias significativas entre las CFUs de *D. torresensis* entre los suelos ($P < 0,01$), siendo más frecuente en la parcela B, aunque sin diferencias significativas con la parcela A. La cantidad de inóculo aislado de suelos en barbecho fue menor que en el resto de suelos donde se cultivaba vid en el momento del muestreo.

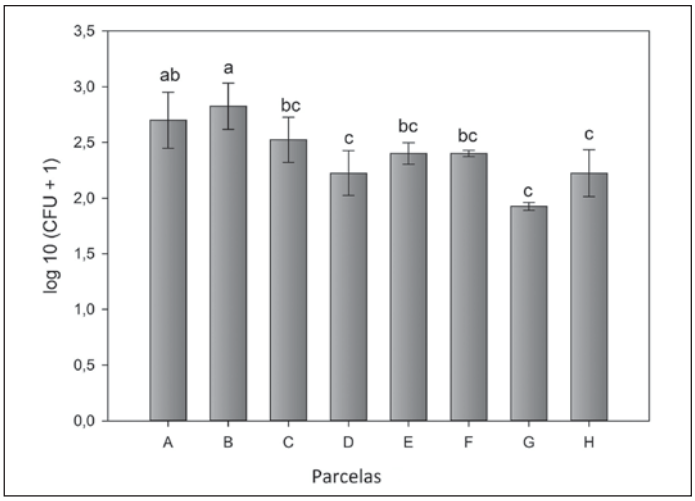


Fig. 2. Media del $\log_{10}$ (Unidades Formadoras de Colonias (CFU) + 1) de *Dactylonectria torresensis* aisladas de suelos de ocho parcelas. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($P$<0.05).

## 3.4. Propiedades fisicoquímicas del suelo

En la Tabla 5 se muestran las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los suelos analizados. El análisis estadístico mediante PCA separó los suelos en dos grandes grupos: los que tenían una concentración media o alta de calcio, y los que tenían un alto porcentaje de potasio (Fig. 3). Por otro lado, el análisis NMDS correlacionó positivamente la cantidad de inóculo fúngico (CFUs) con la concentración de carbonato cálcico (r = 0,61; p < 0,05) (Fig. 4).

**Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los suelos analizados (media±e.s.)**

| Suelo | A | B | C | D | E | F | G | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | 8,42±0,02 | 8,1±0,00 | 8,12±0,05 | 8,12±0,02 | 8,3±0,00 | 8±0,00 | 8,27±0,02 | 8,27±0,02 |
| P mg/100g | 3,47±0,27 | 1,8±0,11 | 1,91±0,20 | 8,07±1,88 | 23,92±0,73 | 10,42±0,08 | 2,5±0,20 | 9,01±0,10 |
| K mg/100g | 15,52±0,59 | 17,3±0,44 | 19,97±0,42 | 33,05±2,57 | 23,17±0,16 | 61,55±0,66 | 26,55±1,83 | 50,92±0,63 |
| S mg/100g | 4,37±0,38 | 0,9±0,27 | 7,95±0,11 | 15,65±1,26 | 14,02±0,33 | 13,6±0,36 | 13,87±0,29 | 2,42±0,05 |
| Mg mg/100g | 25,57±0,29 | 15,0±0,26 | 23,3±0,45 | 49,37±3,52 | 44,57±0,83 | 60,65±0,69 | 32,75±1,11 | 66,2±0,51 |
| Mn mg/100g | 9,31±0,87 | 9,23±0,11 | 2,44±0,12 | 9,62±0,66 | 15,6±0,07 | 11,1±0,04 | 6,37±1,49 | 20,37±0,22 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fe mg/100g | 7,5±0,44 | 3,27±0,07 | 3,18±062 | 9,6±0,38 | 7,71±0,46 | 5,91±0,15 | 4,95±0,49 | 4,42±0,10 |
| Ca mg/100g | 1570,92±220,8 | 1862,15±12,6 | 3437,9±79,6 | 2512,05±231,1 | 534,3±15,1 | 1359,02±12,2 | 2173,97±282,7 | 993,9±10,7 |
| Na mg/100g | 6,08±0,19 | 1,46±0,05 | 1,64±0,02 | 3,31±0,36 | 12,57±0,16 | 9,95±0,15 | 2,22±0,17 | 10,17±0,19 |
| MSO% | 0,74±0,02 | 1,75±0,01 | 1,15±0,00 | 1,61±0,13 | 0,67±0,01 | 2,26±0,04 | 1,12±0,02 | 0,99±0,01 |
| Arcilla% | 21,6±0,25 | 29,42±0,28 | 24,97±0,27 | 15,6±0,26 | 14,37±0,07 | 27,47±0,20 | 26,45±0,43 | 26,3±0,28 |
| Arena% | 37,25±0,29 | 21,62±0,66 | 32,75±0,62 | 38,27±0,45 | 61,47±0,08 | 26,67±0,67 | 29,6±1,09 | 27,72±0,25 |
| Limo% | 41,12±0,05 | 49,0±0,41 | 42,27±0,33 | 46,1±0,37 | 24,12±0,12 | 44,85±0,53 | 43,95±0,71 | 42,17±3,86 |
| $CO_3Ca$ | 15,05±0,03 | 18,67±0,23 | 14,97±0,06 | 11,02±0,56 | 5,77±0,18 | 16,32±0,42 | 7,0±0,71 | 7,35±1,01 |
| $CO_3Ca$ | 15,05±0,03 | 18,67±0,23 | 14,97±0,06 | 11,02±0,56 | 5,77±0,18 | 16,32±0,42 | 7,0±0,71 | 7,35±1,01 |
| CIC mekv/100g | 9,7±0,23 | 21,25±0,10 | 11,3±0,18 | 10,45±0,51 | 8,75±0,43 | 21,55±0,22 | 10,67±1,03 | 18,45±0,18 |
| CE mS/cm | 0,15±0,00 | 0,16±0,00 | 0,15±0,00 | 0,22±0,01 | 0,28±0,00 | 0,31±0,00 | 0,12±0,00 | 0,16±0,00 |
| Ca asim. mekv/100g | 10,2±0,19 | 20,4±0,15 | 11,92±0,14 | 8,92±0,37 | 7,92±0,08 | 19,05±0,15 | 14,35±0,13 | 14,3±0,33 |
| Mg asim. mekv/100g | 1,47±0,03 | 0,8±0,04 | 0,87±0,01 | 2,33±0,21 | 2,32±0,02 | 3,71±0,04 | 1,42±0,01 | 3,47±0,17 |

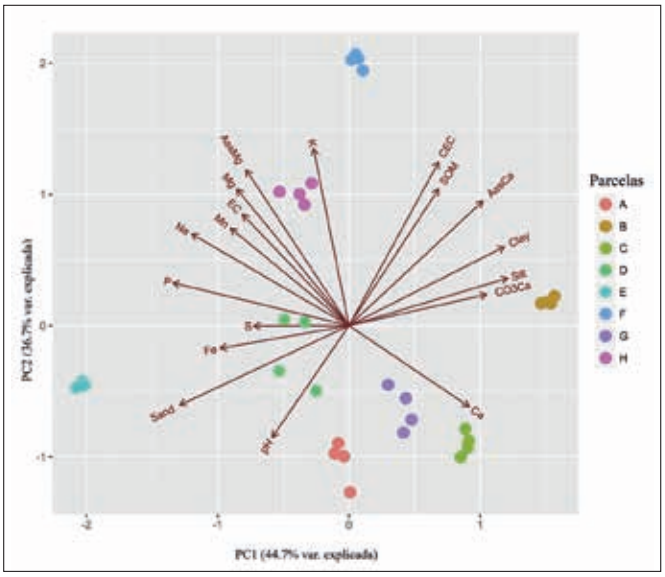


Fig. 3. Análisis de componentes principales (PCA) de las ocho parcelas estudiados relativo a las propiedades fisicoquímicas del sueño. El valor dado entre paréntesis se corresponde con la varianza explicada por cada componente principal.

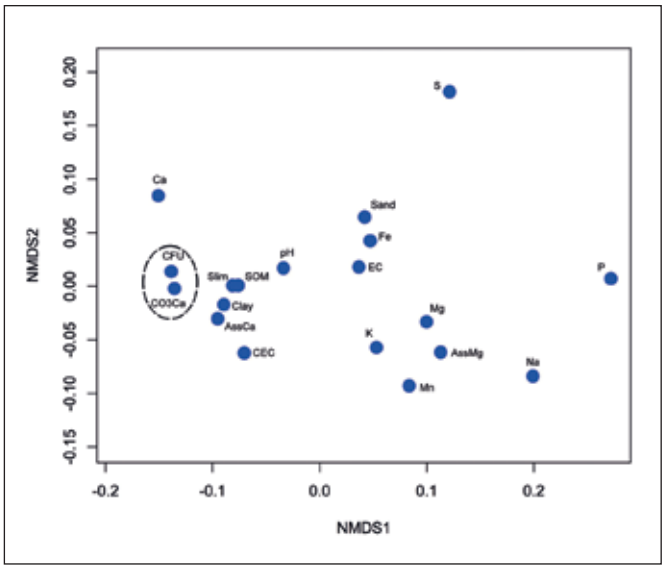


Fig. 4. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en matrices de similitud entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y las unidades formadoras de colonias (CFU) de patógenos asociados al pie negro aislados en suelo.

## 4. DISCUSIÓN

La detección temprana y eficaz de hongos asociados a la enfermedad del pie negro en suelo es fundamental para prevenir la infección del material vegetal en las parcelas de vivero y en viñedo ya establecido. Entre los diferentes medios de cultivo evaluados en este estudio, se eligió el medio Agar Rosa de Bengala con Glucosa e infusión de Haba (GFBRBA) como el más adecuado para para la detección de estos hongos, ya que favoreció la producción de pigmento amarillo-marrón por parte de la mayoría de las especies fúngicas asociadas al pie negro y además presentó una buena capacidad de aislamiento de inóculo de *Dactylonectria torresensis*. Además, el crecimiento micelial de otros hongos del suelo (*Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani)* en el medio seleccionado se vio ralentizado, lo que podría evitar que estas especies colonicen en su totalidad la placa de cultivo antes de la detección de los patógenos asociados al pie negro.

Nuestra investigación confirmó que *D. torresensis* es el patógeno asociado al pie negro con mayor prevalencia en las parcelas estudiadas, lo que coincide con estudios previos realizados en Italia (Carlucci *et a*l., 2017) y Portugal (Reis *et al*., 2013). *D. torresensis* fue descrita como la especie prevalente en el estudio llevado a cabo por Cabral *et al*. (2012), estando pre-

sente en cuatro continentes asociado a *Vitis vinifera*, *Abies nordmanniana*, *Fragaria* sp., y *Quercus* sp. Conviene reseñar que *D. torresensis* también afecta a otras especies leñosas, como *Actinidia chinensis* (kiwi) o *Eriobotrya japonica* (níspero), además de la vid (Lombard *et al.*, 2013; Erper *et al.*, 2013; Aiello *et al.*, 2015).

El conocimiento derivado de estudios en vid y en otras especies leñosas postula que las especies vegetales influyen en la composición de las comunidades microbianas habitantes de la rizosfera (Turner *et al.*, 2013; Zarraonaindia *et al.*, 2015). La selección de la microbiota por parte de las raíces, y en particular de los organismos considerados patógenos, como consecuencia del uso de genotipos concretos de plantas ha sido estudiado ampliamente en otros patosistemas (Lannou y Mundt, 1997; Gandon y Michalakis, 2002; Brown y Tellier, 2011). Sin embargo, en cuanto a la vid, sería necesario seguir investigando en el efecto que la selección de portainjertos y variedades pueda tener en la microbiota del suelo, con especial atención a hongos causantes de las enfermedades de Petri y el pie negro.

Nuestro trabajo también confirmó que las parcelas de vivero son una fuente importante de inóculo de patógenos causantes de la enfermedad del pie negro, tal y como se había publicado anteriormente en nuestro país (Agustí-Brisach *et al.*, 2013a), así como en Italia (Carlucci *et al.* 2017), Portugal (Cardoso *et al.*, 2013) y Sudáfrica (Halleen *et al.*, 2003, 2007). La enfermedad del pie negro causa necrosis en la parte basal del portainjerto, lo que conlleva el decaimiento y finalmente la muerte de la planta en vivero y viñedos jóvenes. Sin embargo, en este estudio también se ha encontrado inóculo de hongos asociados al pie negro en suelo de viñedo adulto (27 años). Las plantas adultas son generalmente menos susceptibles a la infección por parte de estos hongos, probablemente debido a su capacidad de desarrollar mecanismos de defensa más completos o a posibles cambios en la composición y estructura del sistema radicular, haciéndolo menos vulnerable a la infección.

Estudios previos sugieren que la mayoría de las especies asociadas al pie negro producen unas estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, lo que les permite sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo (Schroers *et al.*, 2008; Chaverri *et al.*, 2011). En nuestro trabajo se detectó inóculo viable de *D. torresensis* en parcelas en barbecho. En España, de acuerdo con la legislación vigente, las parcelas de vivero usados para la fase de enraizamiento no pueden ser utilizados durante más de dos años consecutivos, y no deben haber sido plantados con vides al menos durante 12 años. Estos períodos pueden reducirse a uno y seis años, respectivamente, si la parcela es desinfestado previamente contra nematodos. En España, los injertos de vid se plantan en parcelas de vivero durante 8-9 meses, y luego le siguen tres años de rotación de cultivos (preferentemente cereales) y/o barbecho. La técnica del barbecho ha demostrado ser efectiva para reducir las poblaciones de patógenos en viveros de plantas coníferas cultivadas a raíz desnuda (Jones y Benson, 2003). Sin embargo, esta técnica podría no ser tan efectiva para el control de patógenos que residen en el suelo, como

los hongos asociados al pie negro de la vid, y cuyo inóculo es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ausencia de plantas huésped (Schroers *et al*. 2008; Chaverri *et al*. 2011). La hipótesis principal de esta supuesta ineficacia de la técnica del barbecho para reducir el inóculo de los patógenos causantes del pie negro reside en el hecho de que el nivel de este inóculo podría ser mantenido por huéspedes asintomáticos y/ó malas hierbas a través de la rotación de cultivos que se práctica en los viveros. Algunas especies asociadas al pie negro de la vid han sido aisladas de malas hierbas sin síntomas aparentes de enfermedad en diversos viñedos en España (Agustí-Brisach *et al*., 2011). Investigadores sudafricanos sugieren que el sistema de rotación bianual de cultivos podría aumentar el nivel de inóculo de pie negro en suelos (Halleen *et al*., 2003). Esta diversidad fúngica mantenida en suelo por huéspedes asintomáticos podría tener consecuencias negativas a largo plazo en la aplicación de estrategias de manejo contra el pie negro de la vid.

Nuestros resultados mostraron una correlación entre la concentración de carbonato cálcico y la cantidad de inóculo fúngico encontrada en los diferentes suelos. El carbonato de calcio se usa comúnmente para neutralizar la acidez del suelo y como suplemento de calcio para las plantas. En general, investigaciones previas han demostrado que el uso de carbonato cálcico reduce la infección de ciertas enfermedades causadas por patógenos del suelo, como las causadas por *Phytophthora* spp. (Boughton *et al*., 1978) y la fusariosis causada por *Fusarium* spp. (Woltz y Jones, 1981), pero una concentración de calcio excesiva podría aumentar la severidad de la enfermedad (Schmitthenner y Canady, 1983; Spiegel *et al*., 1987).

El suelo es esencial para la producción de vides sanas, no solo porque proporciona el soporte físico sobre el que crecen las plantas, sino porque ofrece un escenario complejo donde se producen interacciones planta-patógenos que residen en el suelo. Por lo tanto, entender cómo las propiedades del suelo afectan al estado sanitario de las plantas y a la biología y ecología de los patógenos, es fundamental para el desarrollo y aplicación de estrategias de control eficaces. Las propiedades fisicoquímicas del suelo pueden favorecer la presencia de unas especies microbianas sobre otras, provocando cambios en la microbiota del suelo (Brant *et al*., 2006; Kaiser *et al*., 2010). Por ello, es necesario seguir investigando en esta dirección para esclarecer las relaciones entre los macronutrientes, micronutrientes y otras propiedades fisicoquímicas del suelo, y su impacto en la incidencia de los hongos asociados al pie negro de la vid.

## 5. CONCLUSIONES

En este estudio se ha desarrollado un método específico, preciso y rápido para detectar propágulos viables de hongos asociados a la enfermedad del pie negro en el suelo, lo cual es crucial para entender la ecología de estos patógenos y poder así diseñar estrategias efectivas de control.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto de investigación "Caracterización, epidemiología y control de los patógenos fúngicos de la madera de la vid en La Rioja R-03-16" (Gobierno de La Rioja). Agradecemos al Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (INTIA), que proporcionó las muestras de suelo de la parcela de Olite, y a P. Yécora y M. Andrés por su asistencia técnica.

Se prevé, en su caso, la cofinanciación del 50% del importe del gasto ocasionado en el desarrollo de este proyecto con cargo a las ayudas del Fondo Europeo de Desarrollo Regional, otorgadas a la Comunidad Autónoma de La Rioja, dentro del Programa Operativo FEDER de La Rioja 2014-2020.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2013a). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology,* 137*,* 103–112.

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

Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., León, M., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2011). Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. *Plant Disease,* 95, 803–810.

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

Aiello, D., Guarnaccia, V., Epifani, F., Perrone, G y Polizzi, G. (2015). *'Cylindrocarpon'* and *Ilyonectria* species causing root and Crown rot disease of potted laurustinus plants in Italy. *Journal of Phytopathology*, 163, 675–680.

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

Boughton, T.J., Malajczuk. N. y Robson, A.D. (1978). Suppression of infection of jarrah roots by *Phytophthora cinnamomi* with application of calcium carbonate. *Australian Journal of Botany,* 26, 611–615.

Brant, J.B., Myrold, D.D. y Sulzman, E.W. (2006). Root controls on soil microbial community structure in forest soils. *Oecologia,* 148, 650–659.

Brown, J.K. y Tellier, M. (2011). Plant-parasite coevolution: Bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 345–367.

Cabello, M. y Arambarri, A. (2002). Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed Celtis tala and Scutia buxifolia forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiological Research*, 157, 115–125.

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

Cardoso, M., Diniz, I., Cabral, A., Rego, C. y Oliveira, H, (2013). Unveiling inoculum sources of black foot pathogens in a commercial grapevine nursery. *Phytopathologia Mediterranea,* 52, 298–312.

Carlucci, A., Lops, F., Mostert, L., Halleen, F. y Raimondo, M.L. (2017). Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 56, 1, 10-39.

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.

Cho, J.H., Rupe, J.C., Cummings, M.S. y Gbur E.E. (2001). Isolation and identification of *Fusarium solani* f sp *glycines* from soil on modified Nash and Syder's medium. *Plant Disease*, 85, 256–260.

Damm, U. y Fourie, P.H. (2005). A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil. *South African Journal of Science,* 101, 135–139.

Demanèche, S., Jocteur-Monrozier, L., Quiquampoix, H. y Simonet, P. (2001). Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology,* 67, 293–299.

Elmholt, S., Labouriau, R., Hestbjerg, H. y Nielsen, L.M. (1999). Detection and estimation of conidial abundance of *Penicillium verrucosum* in soil by dilution plating on a selective and diagnostic agar medium (DYSG). *Mycological Research,* 103, 887–895.

England, L.S., Lee, H. y Trevors, J.T. (1997). Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in soil. *Soil Biology and Biochemistry,* 29, 1521–1527.

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.

Gandon, S. y Michalakis, Y. (2002). Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: Interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology,* 15, 451–462.

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., Crous, P.W. y Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology,* 32, 47–52.

Halleen, F., Fourie, P.H. y Crous, P.W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, S55-S67

Halleen, F., Fourie, P.H. y Crous, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology,* 56, 637-645.

Hunter, B.B., Sylvester, M.A. y Balling, J. (1980). A rapid method for identifying and recovering species of *Cylindrocladium* from soil via geranium leaf baiting and a selective agar medium. *Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science,* 54, 157–160.

Jeewon, R. y Hyde, K.D. (2007). Detection and diversity of fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches. En: *Advanced Techniques in Soil Microbiology*, 11, 1–15.

Jones, R.K. y Benson, D.M. (2003). Diseases of woody ornamentals and trees in nurseries. APS Press, St. Paul., MN. pp. 482.

Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Fuchslueger, L., Schnecker, J., Schweiger, P., Rasche, F., Zechmeister-Boltenstern, S., Sessitsch, A. y Richter A. (2010). Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytologist,* 187, 843–858.

Lannou, C. y Mundt, C.C. (1997). Evolution of a pathogen population in host mixtures: rate of emergence of complex races. *Theoretical and Applied Genetics,* 94, 991–999.

Lombard, L., Bezuidenhout, C.M. y Crous, P.W. (2013). *Ilyonectria* black foot rot associated with Proteaceae. *Australasian Plant Pathology*, 42, 337–349.

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.

Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, E., Wilcox, W.F. y Rolshausen, P.E. (2011). *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture,* 62, 177-183.

Probst, C., Jaspers, M., Jones, E.E. y Ridgway, H.J. (2010). A quantitative PCR method for detecting two *Cylindrocarpon* species in soil. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 115.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna., Austria. URL https://www.R-project.org/

Reedler, R.D., Capell, B.B., Tomlinson, L.D. y Hickey, W.J. (2003). The extraction of fungal DNA from multiple large soil samples. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 25, 182–191.

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

Schmitthenner, A.F. y Canaday, C.H. (1983). Role of chemical factors in development of *Phytophthora* diseases. En: Phytophthora: *Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (Erwin, D.C., Bartnicki-Garciaand. S. y Tsao, P.H., ed.). APS Press., St. Paul., MN, 189–196.

Schroers, H.J., Zerjav, M., Munda, A., Halleen, F. y Crous, P.W. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research*, 112, 82–92.

Singleton, L.L., Mihail, J.D. y Rush, C.M. (1993). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press., St. Paul., MN, 265

Spiegel, Y., Netzer, D. y Kafkafi, U. (1987). The role of calcium nutrition on Fusarium-wilt syndrome of muskmelon. *Journal of Phytopathology,* 118, 220–226.

Tolosa-Almendros, V.M., Lerma, M.L., Castillo, P., Armengol, J. y Muñoz, R.M. (2016) Identificación de especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* en plantas de vid con síntomas de decaimiento. *Abstracts del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.*

Turner, R.T., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant A. y Poole P.S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology,* 7, 2248–2258.

Woltz, S.S. y Jones, J.P. (1981). Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*: basis for a disease control system. En: Fusarium: diseases, biology and taxonomy (Nelson, R.E., Toussoun, T.A. y Cook, R.J., ed.). Penn St Univ Press, University Park, 340–349.

Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N.A., Mills, D.A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D. y Gilbert, J.A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio,* 6(2), e02527–14.

# ZUBÍA

29

9 770213 430604 00029

Gobierno de La Rioja
www.larioja.org

Instituto
de Estudios
Riojanos