

1 PRESENZA DE FUNGOS RESPONSABLES DO P'É NEGRO DA VIDE EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS DE VIVEIRO



Autores artigo orixinal: Carmen Berlanas, Sonia Ojeda, Beatriz López-Manzanares, Marcos Andrés-Sodupe, Rebeca Bujanda, María del Pilar Martínez-Diz, Emilia Díaz-Losada e David Gramaje

En: *Plant Disease*, 104: 94-104. 2020

Os *endófitos* son organismos que viven nos tecidos internos das plantas sen causar prexuízo aparente. É por este motivo que pasan normalmente desapercibidos, a non ser que estes tecidos sexan coidadosamente illados (en condicións asépticas), examinados baixo o microscopio e identificados. Isto é precisamente o que se propuxeron facer estes autores.

A enfermidade do pé negro

Entre os endófitos máis importantes da vide destacan os responsables das enfermidades da madeira, que inclúen: esca, *Eutypa* ou enfermidade do brazo morto, *Phomopsis* ou excoriose, morte regresiva por *Botryosphaeria*, pé negro e enfermidade de Petri, entre outras. A enfermidade do pé negro que nos ocupa é responsable de grandes perdas económicas en todos os países vitícolas, e afecta particularmente o material de viveiro e as plantacións novas, onde as tarefas típicas de desgromado e enxertado, e a manipulación das raíces, tenden a producir feridas que propician a entrada destes patóxenos.



Síntomas internos de pé negro na base do portaenxertos

Unha vez dentro da planta, o fungo pode permanecer latente ata que existan as condicións axeitadas que disparen a súa patoxenidade. Estas condicións poden deberse a factores xenéticos da planta ou a factores abióticos, tales como o estrés. Algúns exemplos de factores de estrés documentados na vide inclúen: enraizamento en “J”, encharcamento, seca, xeadas, deficiencias nutritivas, compactación do terreo e exceso de froita. A sintomatoloxía do pé negro inclúe lesións necróticas e descoloracións marrón-vermelhas nas raíces e na base do tronco. Os síntomas a nivel foliar e de planta inclúen agromado tardío, follas cloróticas coa marxe necrótica, cepas ananizadas e, mesmo, seca de todo o pámpano.

Tradicionalmente, o pé negro da vide foi asociado co xénero *Cylindrocarpon*. Axiña se observou que o que se denominou nun principio *Cylindrocarpon*, era en realidade un grupo moi diverso de xéneros e especies, e foi precisa unha reclasificación. Foi así como xurdiron novos xéneros asociados coa enfermidade, tales como *Campylocarpon*, *Ilyonectria* ou *Cylindrocladiella*. Como imos ver neste traballo, son tan numerosas as especies implicadas que con frecuencia empregamos o termo “fungos do tipo *Cylindrocarpon*” para referirnos aos patóxenos asociados con esta enfermidade.

Incidencia dos patóxenos asociados co pé negro

Os investigadores realizaron unha extensa mostraxe das raíces de portaenxertos enxertados (110 Richter), procedentes de 15 viveiros do norte de España. Dez anacos por planta de raíces secundarias procedentes de plantas asintomáticas (sen rastro da enfermidade do pé negro) foron pelados e o tecido da endorrizosfera foi cultivado

en varios medios nutritivos sucesivos, ata conseguir colonias puras. Deste xeito, foron quen de asociar cada unha das colonias obtidas (1.427 illados) con **13 especies** de fungos, pertencentes a **4 xéneros**:

- *Dactylonectria*
- *Ilyonectria*
- *Neonectria*
- *Thelonectria*

Baseado no número de plantas cribadas, e na presenza ou ausencia dalgunha das especies, os investigadores calcularon a *incidencia* (porcentaxe de plantas infectadas) e a *severidade* (porcentaxe de segmentos de raíz colonizados) da enfermidade. A incidencia do pé negro nos viveiros observados foi moi variable (5-90 %), dependendo da localización do viveiro. A severidade flutuou entre 10-18 %.

Caracterización morfolóxica

Baseado na morfoloxía baixo o microscopio, os autores puideron distinguir tres grupos de fungos, ou tendencias morfolóxicas:

- características típicas de *Thelonectria*: hifas de 5 septos, macroconidias (esporas) rectas, sen presenza de clamidosporas (esporas de resistencia, con paredes grosas);
- características típicas de *Neonectria*: hifas con 5 septos, macroconidias curvas, clamidosporas pouco frecuentes;
- características típicas de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* (estas dúas un pouco máis difíciles de distinguir entre si): hifas con 3 septos, macroconidias esféricas, sin clamidosporas.

Caracterización molecular

O que realmente lles permitiu aos autores diferenciar todos os tipos de fungos foi a caracterización molecular. A grandes liñas, os investigadores extraeron o ADN de cada un dos illados e secuenciaron 4 tipos de xenes (*his3*, *ITS*, *tef1* e *tub2*). A comparación das secuencias resultantes coas procedentes dun banco de



Redución da barbada en raíces afectadas polo pé negro

secuencias (GenBank), para cada un dos xenes secuenciados, permitiu asignar unha especie de fungo determinada a cada illado. Ademais, a similitude entre secuencias posibilitou calcular varios índices para a construción dunha árbore filoxenética que informase da distancia xenética ou “parentesco” entre as diferentes especies.

Algúns dos resultados máis relevantes foron:

- Identificáronse ata 13 especies diferentes asociadas co pé negro, o cal aumenta a 17 o número de especies atopadas en España asociadas con esta enfermidade;
- *Dactylonectria* resultou ser o xénero máis comunmente asociado co pé negro. En concreto, *Dactylonectria torresensis* foi a especie máis prevalente en España;
- Detectáronse por primeira vez en España dúas especies asociadas con esta enfermidade (*Ilyonectria pseudodestructans* e *Neonectria quercicola*);
- Identificáronse dúas especies completamente novas, que se describen con detalle e para as que se propón nomenclatura (*Dactylonectria riojana* e *Ilyonectria vivaria*);



Plantas con menor crecemento debido á enfermidade do pé negro. As plantas elixidas para este estudo foron, no entanto, asintomáticas

- Os investigadores propuxeron dúas posibles árbores filoxenéticas, unha baseada na información obtida das secuencias do xene *hist3* e outra baseada na información obtida dos catro xenes estudados (*ITS*, *tub2*, *his3* e *tef1*).

nectria novozelandica resultou ser a especie máis virulenta, seguido de *Dactylonectria alcacerensis*, *Dactylonectria macrodicyma* e *Ilyonectria vivaria*.

Conclusións

Os autores conseguiron identificar ata 13 especies de fungos asociados coa enfermidade do pé negro da vide a partir de plantas completamente asintomáticas. *Dactylonectria torresensis* foi a especie máis frecuente en España asociada con esta enfermidade, e *Dactylonectria novozelandica* foi a especie máis virulenta. A inmersión de raíces en solucións de esporas resultou ser unha técnica efectiva para avaliar a virulencia das distintas especies. A nivel molecular, as secuencias dos xenes *his3*, *tub2* ou *tef1* resultaron ser, individualmente, unha ferramenta máis útil para diferenciar as especies que a secuencia do xene ITS. Os autores descubriron dúas especies novas de fungos, para as que propoñen a nomenclatura *Dactylonectria riojana* e *Ilyonectria vivaria*. Por último, apuntan a importancia de poder dilucidar nun futuro cales son os factores que fan que un fungo latente comece a causar enfermidade, é dicir, pase de endófito a patóxeno. 🍇

Test do efecto da temperatura e test da patoxenidade

Para determinar o efecto da temperatura sobre o crecemento dos diferentes fungos, os investigadores cultivaron 24 illados (seleccionados ao azar) a temperaturas comprendidas entre 5°C e 35°C que ascendían a intervalos de 5°C. O efecto da temperatura sobre o crecemento do fungo foi estimado medindo o radio (en mm) das colonias resultantes. A temperatura ideal de crecemento para a maior parte dos illados resultou ser entre 19 e 21°C. A maioría dos illados creceron unha media entre 2,5 e 4 mm/día.

Os investigadores compararon a patoxenidade de 24 illados ao azar mediante a inmersión de plantas novas de Tempranillo nunha solución de esporas de cada un dos illados. As plantas inoculadas foron observadas diariamente durante 60 días, e anotáronse para cada unha dous tipos de parámetros: *tempo medio de vida despois da infección* e *porcentaxe de plantas mortas*. *Dactylo-*