



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, FENOTÍPICA,
PATOGENICA Y MEDIOS DE CONTROL DE
Phaeoacremonium aleophilum
Y OTROS HONGOS ASOCIADOS A LOS
DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN**

LAURA MARTÍN BLANCO
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
LEÓN 2012



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, FENOTÍPICA,
PATOGENICA Y MEDIOS DE CONTROL DE
Phaeoacremonium aleophilum
Y OTROS HONGOS ASOCIADOS A LOS
DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN**

LEÓN 2012

Presentado por:

LAURA MARTÍN BLANCO

Licenciada en Biología

Dirigido por la Dra.:

M. TERESA MARTÍN VILLULLAS

Investigadora del ITACyL



INSTITUTO
TECNOLÓGICO
AGRARIO

Junta de Castilla y León
Consejería de Agricultura y Ganadería

El presente trabajo ha sido realizado en el grupo de Investigación de Hongos del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), bajo la supervisión de la Dra. M. Teresa Martín Villullas; y ha sido financiado por el propio ITACyL, por el Programa de Personal Técnico de Apoyo del Ministerio de Educación y Ciencia (PTA-2003-01-01001), por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (proyecto RTA04-127 y RTA2007-07) y por el Plan de Experimentación Agraria de la Junta de Castilla y León.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para mostrar mi agradecimiento hacia todas las instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta investigación: al ITACyL, por darme una oportunidad laboral para desarrollar este trabajo en sus instalaciones; y a la Junta de Castilla y León, al Ministerio de Educación y Ciencia; y al INIA, por participar en su financiación.

Pero este trabajo no vería la luz sin la ayuda y colaboración de muchas personas que me han acompañado en el día a día. Todas ellas merecen unas palabras de reconocimiento.

En primer lugar, gracias a la Dra. María Teresa Martín Villullas, directora de este trabajo. Por todo el tiempo dedicado a esta Tesis, por confiar en mí más que yo misma y por guiarme con entusiasmo e infinita paciencia hacia el camino de la investigación; pero sobre todo por su cercanía personal.

Quisiera agradecer al Dr. Luis E. Sáenz de Miera su enorme disponibilidad así como la atención y el tiempo que ha dedicado a responder mis preguntas.

Gracias a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio, y que han contribuido con ilusión y dedicación al desarrollo de los distintos experimentos. Una muestra especial de gratitud es para M^a José Cuesta, por tenderme siempre una mano, por su profesionalidad y su amistad. Gracias a la Dra. Rebeca Cobos, porque su trabajo ha sido un punto de referencia para mí, por ofrecerme su ayuda y compartir conmigo su experiencia.

Gracias a los miembros de Biología Molecular, y a los compañeros del grupo de Viticultura, por resolver dudas y ceder parte de su espacio y de su material. A los viticultores y los técnicos de los consejos de las distintas denominaciones de origen, por hacer posible las prospecciones de campo y la recogida de muestras.

Por supuesto, gracias a mi familia que me ha apoyado en este reto, y a la luz que me ha acompañado en este largo camino.

A Elena, Saúl, Gloria y Manuel

RESUMEN

Bajo el término “decaimientos de la vid” se incluyen un conjunto de enfermedades causadas por hongos patógenos, que afectan a la madera de la vid en todo el mundo. Los decaimientos de la vid ocasionan pérdida de calidad y cantidad de uva; y concluyen con la muerte de la planta. Prospecciones de campo realizadas en Castilla y León revelaron la presencia de síntomas de yesca y eutipiosis, con una importante variabilidad interanual. De las muestras recogidas se aislaron e identificaron 26 especies fúngicas asociadas a los decaimientos de la vid. Las especies mayoritarias fueron *Diplodia seriata*, *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*. Se citó por primera vez la presencia de siete especies (*Neofusicoccum mediterraneum* y *N. australe*, *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. hispanicum* y *Pm. mortoniae*; *Cylindrocarpon pauciseptatum* y *Cadophora luteo-olivacea*) en Castilla y León; así como *Pm. iranianum* en la Rioja Alavesa. No se establecieron relaciones claras entre sintomatología y hongos fitopatógenos. La técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) permitió comparar la variabilidad intra-específica de *Diplodia seriata*, *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* y generar un panel de marcadores especie-específicos útiles para su detección rápida y simultánea. Mediante la búsqueda de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) específicos y el diseño de SCAR (*Sequence Characterised Amplified Regions*) oligonucleótidos, se desarrolló una PCR sensible, para la detección rápida y rutinaria de *Diplodia seriata*. A partir del análisis de las secuencias del gen de la β -tubulina de *Phaeoacremonium* spp., se diseñó un sistema eficiente de PCR a tiempo real capaz de detectar ADN de *Pm. aleophilum* en madera. El análisis de las secuencias ITS, β -tubulina, actina, calmodulina y factor de elongación 1- α de *Phaeoacremonium* combinado con la caracterización fenotípica evidenció la diversidad genética y morfológica de *Pm. aleophilum*, la especie mayoritaria. Las secuencias de la calmodulina y el factor de elongación 1- α fueron las más informativas en la diferenciación de las siete especies de *Phaeoacremonium* analizadas. Con el estudio de marcadores moleculares (RAPD y AFLP) se detectaron tres grupos genotípicos en *Pm.*

aleophilum, que se relacionaron con la edad y sintomatología de las muestras de vid. La inoculación de sarmientos y plantas jóvenes de vid con *Pm. aleophilum* de cada uno de los tres grupos genotípicos demostró la patogenicidad de esta especie y reveló diferentes grados de virulencia. Se comparó la susceptibilidad de las variedades Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura a la infección por *Pm. aleophilum* y ninguna mostró resistencia. Tempranillo y Viura fueron las variedades más sensibles. Se evaluó la efectividad de Escudo[®] (flusilazol y carbendazima) contra *Pm. aleophilum*. Por primera vez se encontraron aislados de *Pm. aleophilum* resistentes a fungicidas, con una patogenicidad equivalente a los aislados sensibles. Estudios moleculares revelaron la capacidad de algunos aislados resistentes para mutar el codón 198 del gen de la β -tubulina.

ABSTRACT

Several diseases caused by pathogenic fungi and affecting the wood of vines throughout the world are included under the term “grapevine decline”. Grapevine decline causes loss of quality and quantity of grapes; and ends with the death of the plant. Field surveys carried out in Castilla y León revealed the presence of symptoms of esca and eutypa-dieback, with an important inter-annual variability. Twenty-six fungal species were isolated and identified from samples and associated with grapevine decline. *Diplodia seriata*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* were the majority species. Seven species (*Neofusicoccum mediterraneum*, *N. australe*, *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. hispanicum*, *Pm. mortoniae*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* and *Cadophora luteo-olivacea*) were reported for the first time in Castilla y León, as well as *Pm. iranianum* in La Rioja Alavesa. There were no clear relationships between symptoms and phytopathogenic fungi. Using the AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) technique, the intra-specific variability of *Diplodia seriata*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* were compared and a panel of species-specific markers was generated for rapid and simultaneous detection. Specific RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) markers were selected for *Diplodia seriata* and used to design SCAR (*Sequence Characterised Amplified Regions*) primers; a sensitive PCR for rapid and routine detection of *Di. seriata* was developed. An efficient real-time PCR protocol capable of detecting *Pm. aleophilum* DNA in wood was designed by analysing the *Phaeoacremonium* spp β -tubulin gene. The genetic and morphological diversity in *Pm. aleophilum*, the predominant species of the genera, was proved by phenotypic characterization and analysis of the ITS, β -tubulin, actin, calmodulin and translation elongation factor 1- α amplicons of *Phaeoacremonium* spp. Sequences of the calmodulin and elongation factor 1- α were the most informative for differentiation of the seven *Phaeoacremonium* spp. analyzed. By studying molecular markers (RAPD and AFLP), three genotypic groups were detected in *Pm. aleophilum* that were related to age and symptoms of the vine samples. The inoculation of shoots and young grapevine plants with *Pm.*

aleophilum from each of the three genotypic groups confirmed the pathogenicity of this species and revealed different degrees of virulence. The susceptibility of cultivars Tempranillo, Verdejo, Garnacha and Viura to *Pm. aleophilum* infection was compared and none showed resistance. Tempranillo and Viura were the most sensitive varieties. The effectiveness of Escudo[®] (flusilazol and carbendazima) against *Pm. aleophilum* was evaluated. Resistant *Pm. aleophilum* isolates (with an equivalent pathogenicity to the sensitive isolates) were found for the first time. Molecular studies revealed the capacity of some resistant isolates to mutate at codon 198 of the β -tubulin gene.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. LA VID (<i>Vitis vinifera</i>)	3
i. El cultivo de la vid en España.....	5
ii. Importancia de la viticultura en Castilla y León	6
II. LOS DECAIMIENTOS DE LA VID.....	10
i. Pie negro	11
a. Sintomatología	11
b. Etiología y taxonomía.....	12
c. Descripción morfológica de <i>Cylindrocarpon</i>	13
ii. Enfermedad de Petri	13
a. Sintomatología	14
b. Etiología y taxonomía.....	14
c. Descripción morfológica de los hongos implicados.....	15
iii. Yesca.....	18
a. Sintomatología	18
b. Etiología y taxonomía.....	19
c. Descripción morfológica de los hongos implicados.....	20
iv. Eutipiosis	21
a. Sintomatología	21
b. Etiología y taxonomía.....	22
c. Descripción morfológica de <i>Eutypa lata</i>	22
v. Brazo muerto.....	23
a. Sintomatología	23
b. Etiología y taxonomía.....	24
c. Descripción morfológica de Botryosphaeriaceae.....	25
vi. Excoriosis.....	29
a. Sintomatología	29
b. Etiología y taxonomía.....	30
c. Descripción morfológica de <i>Phomopsis viticola</i>	30
III. MEDIDAS DE CONTROL.....	31
i. En viñedos establecidos.....	34
ii. En plantaciones nuevas	35
a. Prácticas culturales	36
b. Mejora sanitaria desde los viveros	36
- <i>Termoterapia</i>	36
- <i>Control químico</i>	36
- <i>Control biológico</i>	37
c. Control integrado.....	38
IV. OBJETIVOS.....	39

V. BIBLIOGRAFÍA.....	40
-----------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN	53
--	-----------

1.1. ANTECEDENTES	55
--------------------------------	-----------

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	60
--------------------------------------	-----------

1.2.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León	60
---	-----------

1.2.2. Muestras de <i>Vitis vinifera</i>	60
---	-----------

1.2.3. Procesamiento y análisis de las muestras.....	61
---	-----------

1.2.4. Identificación morfológica.....	62
---	-----------

1.2.5. Identificación molecular.....	62
---	-----------

1.2.5.1. Extracción de ADN.....	63
---------------------------------	----

1.2.5.2. Amplificación por PCR.....	63
-------------------------------------	----

<i>i. Amplificación con oligonucleótidos universales</i>	<i>63</i>
---	-----------

<i>ii. Amplificación con oligonucleótidos específicos</i>	<i>67</i>
--	-----------

1.2.5.3. Electroforesis en geles de agarosa	69
---	----

1.2.5.4. Purificación y cuantificación de los amplímeros.....	70
---	----

1.2.5.5. Secuenciación	70
------------------------------	----

1.3. RESULTADOS.....	71
-----------------------------	-----------

1.3.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León	71
---	-----------

1.3.2. Identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León	73
--	-----------

1.3.2.1. Especies de la familia Botryosphaeriaceae	76
--	----

1.3.2.2. <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	77
---	----

1.3.2.3. <i>Phaeoacremonium spp.</i>	77
--	----

1.3.2.4. <i>Cylindrocarpon / Ilyonectria spp.</i>	78
---	----

1.3.2.5. <i>Phomopsis viticola</i>	82
--	----

1.3.2.6. <i>Fomitiporia mediterranea</i>	82
--	----

1.3.2.7. <i>Eutypa lata</i>	82
-----------------------------------	----

1.3.2.8. <i>Otras especies fúngicas</i>	83
---	----

1.3.3. Distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León	84
--	-----------

1.1.1.1. Distribución según la edad de la planta	84
--	----

1.1.1.2. Distribución según la sintomatología de las cepas	85
--	----

1.1.1.3. Distribución de los aislados en la planta de vid	88
---	----

1.4. DISCUSIÓN	90
-----------------------------	-----------

1.5. BIBLIOGRAFÍA.....	98
-------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2

AVANCES MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y LA DETECCIÓN DE LAS TRES ESPECIES MAYORITARIAS.....	105
--	------------

2.1. ANTECEDENTES	107
--------------------------------	------------

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	111
--------------------------------------	------------

2.2.1. Caracterización molecular mediante AFLP	111
---	------------

2.2.1.1. Aislados utilizados	111
------------------------------------	-----

2.2.1.2. Extracción y purificación de ADN.....	113
--	-----

2.2.1.3. Marcadores AFLP	113
--------------------------------	-----

<i>i. Restricción-Ligación</i>	<i>114</i>
--------------------------------------	------------

<i>ii. Amplificación preselectiva.....</i>	<i>114</i>
--	------------

<i>iii. Amplificación selectiva.....</i>	<i>114</i>
--	------------

2.2.1.4. Análisis de datos	115
----------------------------------	-----

2.2.2. Detección de <i>Di. seriata</i> mediante la técnica SCAR.....	117
---	------------

2.2.2.1. Selección de oligonucleótidos iniciadores y marcadores RAPD.....	117
---	-----

2.2.2.2. Clonación y secuenciación	118
--	-----

2.2.2.3. Diseño de oligonucleótidos específicos	119
---	-----

2.2.2.4. Amplificación por PCR.....	120
-------------------------------------	-----

2.2.2.5. Especificidad de los oligonucleótidos SCAR	120
---	-----

2.2.2.6. Sensibilidad de los oligonucleótidos SCAR.....	123
---	-----

2.2.2.7. Utilidad de los oligonucleótidos SCAR	123
--	-----

2.2.3. Detección de <i>Pm. aleophilum</i> mediante PCR a tiempo real. 125	
--	--

2.2.3.1. Diseño de oligonucleótidos y sonda.....	125
--	-----

2.2.3.2. Condiciones de amplificación.....	126
--	-----

2.2.3.3. Especificidad del sistema	127
--	-----

2.2.3.4. Sensibilidad del sistema	130
---	-----

<i>i. ADN genómico</i>	<i>131</i>
------------------------------	------------

<i>ii. Esporas fúngicas</i>	<i>131</i>
-----------------------------------	------------

2.2.3.5. Utilidad del sistema.....	132
------------------------------------	-----

2.3. RESULTADOS.....	133
-----------------------------	------------

2.3.1. Caracterización molecular mediante AFLP	133
---	------------

2.3.2. Detección de <i>Di. seriata</i> mediante la técnica SCAR.....	139
2.3.2.1. Selección de oligonucleótidos iniciadores y marcadores RAPD	139
2.3.2.2. Diseño de oligonucleótidos SCAR	140
2.3.2.3. Amplificación por PCR.....	141
2.3.2.4. Especificidad de los oligonucleótidos SCAR.....	141
2.3.2.5. Sensibilidad de los oligonucleótidos SCAR.....	143
2.3.2.6. Utilidad de los oligonucleótidos SCAR.....	144
2.3.3. Detección de <i>Pm. aleophilum</i> mediante PCR a tiempo real .	145
2.3.3.1. Selección de oligonucleótidos	145
2.3.3.2. Especificidad del sistema	145
2.3.3.3. Sensibilidad del sistema	146
<i>i. ADN genómico</i>	146
<i>ii. Esporas fúngicas</i>	147
2.3.3.4. Utilidad del sistema	147
2.4. DISCUSIÓN	149
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	155

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>Phaeoacremonium</i> PRESENTES EN VID.....	159
3.1. ANTECEDENTES	161
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	164
3.2.1. Aislados fúngicos	164
3.2.1.1. Material vegetal	164
3.2.1.2. Aislados de <i>Phaeoacremonium</i>	166
<i>i. Técnica RAPD</i>	168
<i>ii. Técnica AFLP</i>	168
<i>iii. Secuenciación parcial de genes</i>	168
<i>iv. Caracterización morfológica y fenotípica</i>	168
3.2.2. Caracterización molecular mediante la técnica RAPD.....	169
3.2.2.1. Extracción y purificación de ADN	169

3.2.2.2.	Selección de oligonucleótidos iniciadores.....	169
3.2.2.3.	Condiciones de amplificación.....	170
3.2.2.4.	Análisis de datos	170
	<i>i. Análisis inter-específico</i>	170
	<i>ii. Análisis intra-específico</i>	171
	<i>iii. Diversidad genética</i>	171
	<i>iv. Análisis de agrupamiento</i>	172
3.2.3.	Caracterización molecular mediante la técnica AFLP.....	173
3.2.4.	Caracterización molecular mediante análisis de secuencias	173
3.2.4.1.	Extracción de ADN	173
3.2.4.2.	Amplificación de ADN mediante PCR	174
	<i>i. Región ITS</i>	174
	<i>ii. β-tubulina</i>	174
	<i>iii. Actina</i>	175
	<i>iv. Calmodulina</i>	176
	<i>v. Factor de Elongación 1-α (EF1-α)</i>	176
3.2.4.3.	Electroforesis en geles de agarosa	177
3.2.4.4.	Purificación y secuenciación	177
3.2.4.5.	Análisis de datos	177
	<i>i. Edición de las secuencias obtenidas</i>	177
	<i>ii. Alineamientos</i>	177
	<i>iii. Análisis filogenético</i>	178
	<i>iv. Análisis intra-específico de <i>Pm. aleophilum</i></i>	180
3.2.5.	Caracterización morfológica y fenotípica	181
3.2.5.1.	Tasa de crecimiento.....	182
3.2.5.2.	Capacidad de esporulación	182
3.2.5.3.	Dimensión de los conidios.....	182
3.2.5.4.	Color del reverso de la colonia	182
3.2.5.5.	Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i>	183
3.3.	RESULTADOS	183
3.3.1.	Caracterización molecular mediante la técnica RAPD	183
3.3.1.1.	Análisis inter-específico	187
	<i>i. Análisis de semejanza genética</i>	188
	<i>ii. Análisis de agrupamiento</i>	189

3.3.1.2.	Análisis intra-específico de <i>Pm. aleophilum</i>	191
	<i>i. Diversidad genética</i>	193
	<i>ii. Análisis intra-específico de distancias genéticas (NJ)</i>	193
	<i>iii. Análisis de agrupamiento</i>	197
3.3.2.	Caracterización molecular mediante la técnica AFLP.....	198
3.3.2.1.	Análisis intra-específico de <i>Pm. aleophilum</i>	198
	<i>i. Diversidad genética</i>	200
	<i>ii. Análisis intra-específico de distancias genéticas (NJ)</i>	200
	<i>iii. Análisis de agrupamiento</i>	203
3.3.3.	Caracterización molecular mediante análisis de secuencias.....	205
3.3.3.1.	Región ITS	205
	<i>i. Análisis BLASTN</i>	205
	<i>ii. Alineamiento y filogenia</i>	206
	<i>iii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i></i>	207
3.3.3.2.	β -tubulina, exones 2 a 6	208
	<i>i. Análisis BLASTN</i>	208
	<i>ii. Alineamiento y filogenia</i>	209
	<i>iii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i></i>	209
3.3.3.3.	β -tubulina, exones 6 a 7	211
	<i>i. Alineamiento y filogenia</i>	211
	<i>ii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i></i>	214
3.3.3.4.	Actina	214
	<i>i. Análisis BLASTN</i>	214
	<i>ii. Alineamiento y filogenia</i>	215
	<i>iii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i></i>	215
3.3.3.5.	Calmodulina	217
	<i>i. Análisis BLASTN</i>	217
	<i>ii. Alineamiento y filogenia</i>	218
	<i>iii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i></i>	218
3.3.3.6.	Factor de elongación 1- α (FE1- α).....	220

i. Análisis BLASTN.....	220
ii. Alineamiento y filogenia.....	221
iii. Variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i>	221
3.3.3.7. Análisis filogenético completo	223
3.3.3.8. Nuevas secuencias depositadas en GenBank.....	226
3.3.3.9. Análisis intra-específico de <i>Pm. aleophilum</i>	226
i. Diversidad genética.....	226
ii. Diagrama de redes	227
iii. Nuevas secuencias depositadas en GenBank.....	228
iv. Comparación de matrices de distancia	229
3.3.4. Caracterización morfológica y fenotípica	230
3.3.4.1. <i>Phaeoacremonium viticola</i>	230
3.3.4.2. <i>Phaeoacremonium hispanicum</i>	231
3.3.4.3. <i>Phaeoacremonium mortoniae</i>	231
3.3.4.4. <i>Phaeoacremonium iranianum</i>	232
3.3.4.5. <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	232
3.4. DISCUSIÓN.....	237
3.5. BIBLIOGRAFÍA	247

CAPÍTULO 4

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE AISLADOS DE <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> RESISTENTES A FUNGICIDAS.....	253
4.1. ANTECEDENTES	255
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	260
4.2.1. Patogenicidad y virulencia de <i>Pm. aleophilum</i>.....	260
4.2.1.1. Aislados utilizados	260
4.2.1.2. Inoculaciones	260
i. Sarmientos	261
ii. Plantas injertadas	262
4.2.1.3. Parámetros evaluados	263
4.2.1.4. Sensibilidad de la variedad de <i>Vitis vinifera</i>	265

4.2.2. Resistencia a fungicidas de <i>Pm. aleophilum</i>	265
4.2.2.1. Ensayo <i>in vitro</i>	265
<i>i. Aislados utilizados</i>	265
<i>ii. Fungicidas</i>	268
4.2.2.2. Ensayo en sarmientos.....	268
<i>i. Aislados utilizados</i>	268
<i>ii. Inoculaciones</i>	269
4.2.2.3. Análisis genético.....	270
<i>i. AFLP</i>	270
<i>ii. β-tubulina</i>	271
4.3. RESULTADOS	272
4.3.1. Patogenicidad y virulencia de <i>Pm. aleophilum</i>	272
4.3.1.1. Sarmientos.....	272
4.3.1.2. Plantas injertadas	276
4.3.2. Resistencia a fungicidas de <i>Pm. aleophilum</i>	283
4.3.2.1. Ensayo <i>in vitro</i>	283
4.3.2.2. Ensayo en sarmientos.....	285
4.3.2.3. Análisis genético.....	286
<i>i. AFLP</i>	286
<i>ii. β-tubulina</i>	288
4.4. DISCUSIÓN	291
4.4.1. Patogenicidad y virulencia de <i>Pm. aleophilum</i>	291
4.4.2. Resistencia a fungicidas de <i>Pm. aleophilum</i>	295
4.5. BIBLIOGRAFÍA	299
DISCUSIÓN GENERAL	303
BIBLIOGRAFÍA	311
CONCLUSIONES	315

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Superficie cultivada y producción total de vid en el mundo (año 2010)	5
Tabla I.2. Resumen anual de la superficie de viñedo en España (año 2010)	6
Tabla I.3. Principales variedades de vid utilizadas en las DD.OO. de Castilla y León, y tipos de vino elaborados	8
Tabla I.4. Superficie de viñedo y número de viticultores inscritos al final de la campaña 2010/2011, cálculo de la superficie media por viticultor; comercialización total y valor económico del comercio total en cada DD.OO. de Castilla y León	9
Tabla II.1. Número y nomenclatura de las especies conocidas del género <i>Phaeacremonium</i> y su teleomorfo <i>Togninia</i> . Especies aisladas en plantas de vid y especies identificadas hasta el momento en España.....	16
Tabla 1.2.1. Parcelas muestreadas a lo largo de este estudio	60
Tabla 1.2.2. Secuencias de los oligonucleótidos universales y condiciones de amplificación por PCR empleadas en la identificación molecular	67
Tabla 1.2.3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos y condiciones de amplificación por PCR empleadas en la identificación molecular de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , <i>Phaeacremonium aleophilum</i> , <i>Fomitiporia mediterranea</i> , <i>Eutypa lata</i> y <i>Cryptovalsa ampelina</i>	69
Tabla 1.3.1. Números de acceso proporcionados por la base de datos GenBank para las secuencias amplificadas de tres aislados de las especies <i>L. theobromae</i> , <i>N. mediterraneum</i> y <i>N. australe</i>	77
Tabla 1.3.2. Números de acceso proporcionados por la base de datos GenBank para las secuencias amplificadas de cuatro aislados del género <i>Phaeacremonium</i>	78
Tabla 2.2.1. Aislados de <i>Di. seriata</i> utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP.	112
Tabla 2.2.2. Aislados de <i>Pa. chlamydospora</i> utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP.	112
Tabla 2.2.3. Aislados de <i>Pm. aleophilum</i> utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP.	113
Tabla 2.2.4. Oligonucleótidos específicos diseñados para la identificación y detección específica de <i>Di. seriata</i>	120
Tabla 2.2.5. Aislados de <i>Di. seriata</i> (47) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para identificar <i>Di. seriata</i>	121
Tabla 2.2.6. Aislados de Botryosphaeriaceae spp. (29) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para la identificación de <i>Di. seriata</i>	122

Tabla 2.2.7. Aislados de otras especies (24) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para la identificación de <i>Di. seriata</i>	123
Tabla 2.2.8. Oligonucleótidos y sonda diseñados para la detección específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante PCR a tiempo real.....	126
Tabla 2.2.9. Aislados de <i>Pm. aleophilum</i> (61) utilizados en el ensayo de especificidad del sistema de detección de <i>Pm. aleophilum</i> por PCR a tiempo real.....	127
Tabla 2.2.10. Listado de otras especies de hongos incluidas en el ensayo de especificidad del sistema de detección de <i>Pm. aleophilum</i> por PCR a tiempo real.....	129
Tabla 2.3.1. Número de fragmentos amplificados en el análisis AFLP de los 52 aislados estudiados (17 de <i>Di. seriata</i> , 18 de <i>Pa. chlamydospora</i> y 17 de <i>Pm. aleophilum</i>). Variabilidad genética intra-específica y porcentaje de desequilibrio gamético.....	133
Tabla 2.3.2. Tamaño (en pb) de los fragmentos especie-específicos obtenidos con la técnica AFLP para <i>Di. seriata</i> , <i>Pa. chlamydospora</i> y <i>Pm. aleophilum</i> , y utilizados para crear un panel de marcadores que permita una detección simultánea de las tres especies.	137
Tabla 2.3.3. Resultados obtenidos en el análisis de las secuencias de los 55 clones transformantes estudiados.	141
Tabla 2.3.4. Combinación de los tres oligonucleótidos específicos diseñados para la identificación de <i>Di. seriata</i> en dos reacciones de PCR y su temperatura óptima de hibridación.....	141
Tabla 2.3.5. Resultados de la identificación morfológica y molecular mediante digestión enzimática del fragmento ITS1-NL4 de los re-aislados de Botryosphaeriaceae spp. obtenidos a partir de plantas inoculadas.....	144
Tabla 2.3.6. Determinación de los límites de detección obtenidos en el ensayo de PCR a tiempo real (TaqMan [®]) con el ADN genómico del aislado Y161-19-2a de <i>Pm. aleophilum</i>	146
Tabla 2.3.7. Determinación de los límites de detección obtenidos en el ensayo de PCR a tiempo real (TaqMan [®]) con las esporas del aislado Y161-19-2a de <i>Pm. aleophilum</i>	147
Tabla 2.3.8. Detección de <i>Pm. aleophilum</i> a partir de astillas de madera infectada utilizando el sistema de PCR a tiempo real (TaqMan [®]) diseñado.	148
Tabla 3.2.1. Distribución de los aislados de <i>Phaeoacremonium</i> según los síntomas de decaimiento observados en las plantas de vid analizadas.	164
Tabla 3.2.2. Datos de las plantas de vid cultivadas en Castilla y León y analizadas en nuestro laboratorio.	165
Tabla 3.2.3. Datos de las plantas de vid cultivadas en Castilla y León y analizadas en el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia (Salamanca).	165

Tabla 3.2.4. Datos de las plantas de vid cultivadas en otras regiones vitivinícolas de España y analizadas en nuestro laboratorio.	166
Tabla 3.2.5. Listado de aislados de aislados de <i>Phaeoacremonium</i> seleccionados para desarrollar los ensayos de caracterización molecular y fenotípica.....	167
Tabla 3.2.6. Número de iniciadores OPERON de cada serie que han sido probados y seleccionados para el análisis RAPD.	169
Tabla 3.2.7. Secuencias de los oligonucleótidos universales y condiciones empleadas para amplificar por PCR parte de los genes de la actina y la calmodulina en <i>Phaeoacremonium</i> spp.	176
Tabla 3.2.8. Secuencias obtenidas de la base de datos GenBank e incluidas en el análisis filogenético utilizando el método Neighbor-Joining.	179
Tabla 3.3.1. Número de marcadores RAPDs obtenidas con cada iniciador ensayado.....	183
Tabla 3.3.2. Número de bandas presentes y ausentes en cada una de las especies de <i>Phaeoacremonium</i> analizadas mediante RAPD.....	188
Tabla 3.3.3. Número de bandas observadas y número de haplotipos generados en el análisis de la variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante RAPD.	191
Tabla 3.3.4. Análisis de los 92 loci generados en el ensayo RAPD en los 12 aislados para los que se examinaron al menos dos cultivos monospóricos.	192
Tabla 3.3.5. Número de fragmentos amplificados y número de haplotipos generados en el análisis de la variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante AFLP.	198
Tabla 3.3.6. Análisis de los 358 loci generados en el ensayo AFLP en los 3 aislados para los que se examinaron dos cultivos monospóricos.....	200
Tabla 3.3.7. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cinco grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie <i>Pm. aleophilum</i> en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la β -tubulina que contiene los exones del 2 al 6.....	211
Tabla 3.3.8. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cuatro grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie <i>Pm. aleophilum</i> en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la actina.....	217
Tabla 3.3.9. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los siete grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie <i>Pm. aleophilum</i> en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la calmodulina.	220
Tabla 3.3.10. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cinco grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie <i>Pm. aleophilum</i> en base al análisis de la secuencia parcial del gen FE1- α	223

Tabla 3.3.11. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de cuatro especies de <i>Phaeoacremonium</i>	226
Tabla 3.3.12. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de cuatro monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i>	229
Tabla 3.3.13. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de dos monospóricos del aislado Y086-15-1 de <i>Pm. aleophilum</i>	229
Tabla 3.3.14. Valores de ajuste <i>R</i> , obtenidos al comparar las matrices de distancia resultantes de los análisis de caracterización intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante el test de Mantel.....	230
Tabla 3.3.15. Peso de las variables fenotípicas analizadas en los tres componentes principales extraídos del análisis multivariante.....	234
Tabla 3.3.16. Resumen de la caracterización fenotípica de <i>Pm. aleophilum</i> y su correlación con los grupos intra-específicos encontrados en los análisis de caracterización molecular (RAPD, AFLP y secuenciación de múltiples genes).	236
Tabla 3.4.1. Comparación de los resultados obtenidos al evaluar la variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante RAPD en Italia, Francia y España.....	242
Tabla 3.4.2. Comparación de los resultados obtenidos al evaluar la variabilidad intra-específica de <i>Pm. aleophilum</i> mediante el análisis de secuencias y marcadores moleculares RAPD y AFLP	244
Tabla 4.2.1. Cultivos monospóricos utilizados para evaluar la patogenicidad y virulencia de <i>Pm. aleophilum</i> en este trabajo.....	260
Tabla 4.2.2. Número de sarmientos verdes y plantas utilizadas para investigar la patogenicidad y virulencia de seis monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i>	263
Tabla 4.2.3. Aislados de <i>Pm. aleophilum</i> utilizados en el ensayo <i>in vitro</i> de resistencia al fungicida Escudo®	266
Tabla 4.3.1. Índice de severidad \pm error estándar, obtenido en el análisis de sarmientos verdes inoculados con <i>Pm. aleophilum</i>	273
Tabla 4.3.2. Índice de severidad \pm error estándar, obtenido en el análisis de plantas inoculadas con <i>Pm. aleophilum</i>	278
Tabla 4.3.3. Síntomas externos observados en las plantas inoculadas con <i>Pm. aleophilum</i>	282
Tabla 4.3.4. Aislados de <i>Pm. aleophilum</i> resistentes al fungicida Escudo® y aislados sensibles procedentes de la misma planta.	283
Tabla 4.3.5. Resultados de los tres ensayos <i>in vitro</i> realizados para evaluar la eficiencia de tres fungicidas sobre 12 cultivos monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i>	284

Tabla 4.3.6. Número de fragmentos amplificados y número de perfiles genéticos generados en el análisis genético de <i>Pm. aleophilum</i> resistentes a fungicidas mediante AFLP.	287
Tabla 4.3.7. Nucleótidos y aminoácidos observados en las posiciones variables del exón 6 del gen de la β-tubulina (amplificado con los oligonucleótidos L2 y R1) de 12 monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i>.	289

ÍNDICE DE FIGURAS

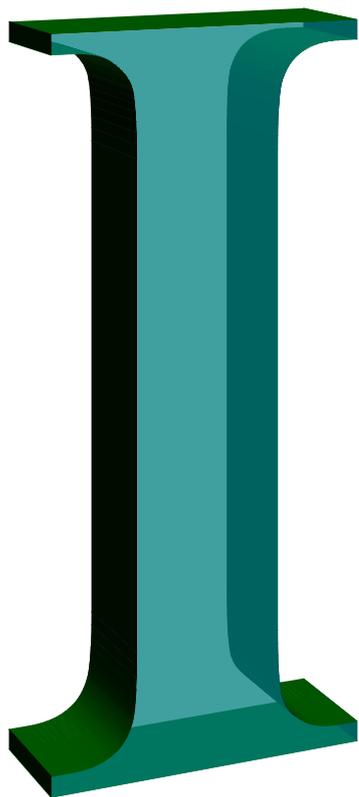
Figura I.1. Mapa geográfico de la superficie de viñedo y sellos de calidad de las nueve denominaciones de origen de Castilla y León	7
Figura II.1. Pie negro	17
Figura II.2. Enfermedad de Petri	17
Figura II.3. Yesca	17
Figura II.4. Eutipiosis.....	28
Figura II.5. Brazo muerto (BDA)	28
Figura II.6. Excoriosis	28
Figura 1.1.1. Enfermedades de los decaimientos de la vid.....	56
Figura 1.2.1. Representación esquemática de una unidad de ADNr (A); de la región parcial del gen de la β -tubulina (B); y de la región parcial del FE 1- α (C); y localización de los oligonucleótidos universales utilizados en la identificación de los aislados fúngicos.....	63
Figura 1.3.1. Incidencia (%) de eutipiosis y yesca en Castilla y León durante los años 2007-2010	71
Figura 1.3.2. Incidencia de eutipiosis (%) en seis DD.OO. de Castilla y León durante el periodo 2007-2010.....	72
Figura 1.3.3. Incidencia de yesca (%) en seis DD.OO de Castilla y León durante el periodo 2007-2010.....	73
Figura 1.3.4. Porcentaje de 415 muestras de vid de las cuáles se aislaron hongos asociados a los decaimientos de la vid	74
Figura 1.3.5. Características morfológicas (en medio PDA) de los hongos mayoritarios asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León	75
Figura 1.3.6. Número de aislados de las diez especies de la familia Botryosphaeriaceae identificados en este trabajo	76
Figura 1.3.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos Bt1a y Bt1b.....	79
Figura 1.3.8. Número de aislados de las cuatro especies del género <i>Cylindrocarpon</i> / <i>Ilyonectria</i> identificados en este trabajo.	80
Figura 1.3.9. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la β -tubulina de <i>Cylindrocarpon</i> / <i>Ilyonectria</i> spp., calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.....	81
Figura 1.3.10. Porcentaje de las especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid identificadas en este trabajo	84
Figura 1.3.11. Frecuencia de las especies mayoritarias de los hongos aislados: (1) en planta joven y (2) en planta adulta.....	85

Figura 1.3.12. A-E: Sintomatología de plantas jóvenes con enfermedad de Petri o pie negro. F-K: Sintomatología de plantas con eutipiosis. L-R: Sintomatología de plantas con yesca.....	86
Figura 1.3.13. Frecuencia de las especies mayoritarias de hongos aislados: (1) en cepas jóvenes con síntomas de enfermedad de Petri o pie negro, (2) en plantas adultas con síntomas de eutipiosis, (3) en plantas adultas con síntomas de yesca, (4) en cepas con otros síntomas y (5) en plantas sin síntomas (en su mayoría jóvenes).....	87
Figura 1.3.14. Frecuencia de las especies mayoritarias de los hongos aislados: (1) en la raíz, (2) en la inserción de la raíz, (3) en la madera del portainjerto, (4) en la zona del injerto y (5) en la madera de la variedad.	89
Figura 2.2.1. A: Método de inoculación empleado en plantas jóvenes. B: Corte transversal realizado cuatro meses después de la inoculación con <i>Di. seriata</i> . C: Corte transversal realizado cuatro meses después de la inoculación con <i>Pm. aleophilum</i>	124
Figura 2.3.1. Diagrama de Venn en el que se muestra la distribución de los marcadores de tipo AFLP obtenidos en este trabajo.....	134
Figura 2.3.2. Dendograma construido utilizando el método Neighbour-Joining a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{jxy})$ de los 52 aislados estudiados mediante AFLP..	136
Figura 2.3.3. Imagen del gel mostrada por el programa GeneMarker (SoftGenetics LLC TM) durante el procesamiento de los datos obtenidos con la combinación de oligonucleótidos <i>EcoRI-AA/MseI-CG</i>	138
Figura 2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % TAE en el que se muestran los fragmentos amplificados con OPE20.	140
Figura 2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4.	142
Figura 2.3.6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6.	142
Figura 2.3.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los resultados de sensibilidad utilizando los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4.	143
Figura 2.3.8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los resultados de sensibilidad utilizando los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6.	143
Figura 3.2.1. Representación esquemática de la región parcial del gen de la actina (A) y la calmodulina (B); y localización de los oligonucleótidos empleados en la caracterización de <i>Phaeoacremonium</i>	175
Figura 3.3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificados con el iniciador OPO15.....	184

Figura 3.3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificadas con el iniciador OPA16.	185
Figura 3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificadas en la caracterización mediante RAPD.	186
Figura 3.3.4: Dendograma construido a partir del coeficiente de similitud calculado según Nei & Li (1979) con la matriz de datos binarios basada en 131 marcadores RAPD de los 40 monospóricos de <i>Phaeoacremonium</i> analizados.	189
Figura 3.3.5. Resultados del análisis de agrupamiento realizado a partir de los 131 marcadores RAPDs de los 40 monospóricos de <i>Phaeoacremonium</i> caracterizados en este trabajo.	190
Figura 3.3.6. Dendograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{jxy})$ de los 27 haplotipos diferentes de <i>Pm. aleophilum</i> derivados del análisis RAPD.....	195
Figura 3.3.7. Dendograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - Q_{xy})$ de los 27 haplotipos diferentes de <i>Pm. aleophilum</i> derivados del análisis RAPD.....	196
Figura 3.3.8. Imagen obtenida con el software GeneMarker, para la verificación manual de los marcadores AFLPs. La figura muestra los resultados de cuatro monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i> amplificadas con la combinación <i>EcoRI-AA/MseI-CT</i>	199
Figura 3.3.9. Dendograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{jxy})$ de los 17 haplotipos diferentes de <i>Pm. aleophilum</i> derivados del análisis AFLP.....	201
Figura 3.3.10. Dendograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - Q_{xy})$ de los 17 haplotipos diferentes de <i>Pm. aleophilum</i> derivados del análisis AFLP.	202
Figura 3.3.11. Resultados del análisis de agrupamiento realizado a partir de los 358 marcadores AFLPs de los 17 monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i> caracterizados en este trabajo.	204
Figura 3.3.12. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	207
Figura 3.3.13. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la β -tubulina (exones 2 a 6), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	210
Figura 3.3.14. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la β -tubulina (exones 6 a 7), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	213
Figura 3.3.15. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del	

gen de la actina, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	216
Figura 3.3.16. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la calmodulina, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	219
Figura 3.3.17. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen del factor de elongación 1- α , calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura.	222
Figura 3.3.18. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo TN93 (Tamura & Nei, 1993) a partir del alineamiento concatenado de la región ITS y los genes parciales de la β -tubulina (exones 2 a 6), β -tubulina (exones 6 a 7), actina, calmodulina y FE1- α	225
Figura 3.3.19. Diagrama de redes basado en las 29 diferencias de nucleótidos observadas en el análisis múltiple de genes de <i>Pm. aleophilum</i>	228
Figura 3.3.20. Aspecto morfológico del aislado Y271-03-1 identificado como <i>Pm. viticola</i> en medio PDA, transcurridas seis semanas.	231
Figura 3.3.21. Aspecto morfológico del aislado Y549-09-3 identificado como <i>Pm. hispanicum</i> en medio PDA.	231
Figura 3.3.22. Aspecto morfológico de distintos aislados de <i>Pm. aleophilum</i> en medio PDA, transcurridas seis semanas.	232
Figura 3.3.23. Proyección de los 33 monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i> caracterizados fenotípicamente sobre el plano de los componentes principales.	233
Figura 3.3.24. Proyección de las variables analizadas sobre el plano de los componentes principales.	235
Figura 4.2.1. A: Método de inoculación en sarmientos verdes. B: Disposición de los sarmientos inoculados en tubos Falcon [®] y gradillas en la cámara bajo condiciones controladas.	261
Figura 4.2.3. A: Sarmientos verdes impregnados con Escudo [®] . B: Inoculación de sarmientos verdes impregnados con Escudo [®]	269
Figura 4.2.4. Representación esquemática de la región parcial del gen de la β -tubulina y localización de todos los pares de oligonucleótidos utilizados en la caracterización de <i>Phaeoacremonium</i>	271
Figura 4.3.1. Gráfico construido con los valores del índice de severidad obtenidos en el análisis de sarmientos verdes inoculados con <i>Pm. aleophilum</i>	274
Figura 4.3.2. Aspecto de los sarmientos verdes inoculados con <i>Pm. aleophilum</i> y escala de síntomas utilizada en este trabajo para calcular el índice de McKinney.	275

Figura 4.3.3. Gráfico construido con los valores del índice de McKinney obtenidos en el análisis de sarmientos verdes inoculados con <i>Pm. aleophilum</i>	276
Figura 4.3.4. Gráfico construido con los valores del índice de severidad obtenidos en el análisis de plantas inoculadas con <i>Pm. aleophilum</i>	279
Figura 4.3.5. Aspecto de las plantas inoculadas con <i>Pm. aleophilum</i> y escala de síntomas utilizada en este trabajo para calcular el índice de McKinney.	280
Figura 4.3.6. Gráfico construido con los valores del índice de McKinney obtenidos en el análisis de plantas inoculadas con <i>Pm. aleophilum</i>	281
Figura 4.3.7. A: Síntomas foliares observados en la variedad Tempranillo inoculada con el monospórico Y038-05-3a. B y C: Formación de chancro en plantas de las variedades Tempranillo y Verdejo inoculadas con los monospóricos Y108-02-2z e Y038-05-3z, respectivamente. D: Síntomas de apoplejía y muerte de una planta de la variedad Verdejo inoculada con el monospórico Y038-05-3a.	282
Figura 4.3.8. Índice de severidad calculado a partir de la inoculación con <i>Pm. aleophilum</i> de sarmientos verdes de la variedad Tempranillo impregnados o no con fungicida.	285
Figura 4.3.9. Dendograma construido a partir del coeficiente de similitud calculado según Nei & Li (1979) con la matriz de datos binarios basada en 992 marcadores AFLP polimórficos de 12 monospóricos de <i>Pm. aleophilum</i> (6 sensibles y 6 resistentes).	286
Figura 4.3.10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos L2 y R1.	288
Figura 4.3.11. Alineamiento de los aminoácidos del exón 6 del gen de la β -tubulina.....	290



Introducción general

I. LA VID (*Vitis vinifera*)

- i. El cultivo de la vid en España
- ii. Importancia de la viticultura en Castilla y León

II. LOS DECAIMIENTOS DE LA VID

- i. Pie negro
- ii. Enfermedad de Petri
- iii. Yesca
- iv. Eutipiosis
- v. Brazo muerto
- vi. Excoriosis

III. MEDIDAS DE CONTROL

- i. En viñedos establecidos
- ii. En plantaciones nuevas

IV. OBJETIVOS

V. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. LA VID (*Vitis vinifera*)

El cultivo de la vid y la elaboración del vino son tan antiguos que es difícil precisar con exactitud su lugar de origen y cronología. La teoría más aceptada sitúa el origen de la vid en la región del Cáucaso hacia los 4000 o 5000 años antes de Cristo. Su cultivo se extendió hacia Mesopotamia, Egipto, Siria y Fenicia. Se cree que fue introducido en el sur de la Península Ibérica por el pueblo comerciante de los fenicios hace unos 3000 años. Los griegos y los romanos también contribuyeron a la propagación del cultivo de la vid en su imperio y todas las tierras conquistadas. La viticultura fue extendiéndose por todo el continente europeo, mantenida y mejorada por las órdenes religiosas y la nobleza a lo largo de los siglos. Finalmente, el cultivo de la vid fue introducido en el continente americano por los colonos españoles (Hidalgo, 2002), y en el resto del mundo a través de las sucesivas colonizaciones.

La vid (*Vitis vinifera*, L.) pertenece a la familia Vitaceae y al género *Vitis*, el cuál se divide en dos subgéneros: *Muscadinia* y *Euvtis* (Hidalgo, 2002). El subgénero *Muscadinia* contiene una sólo especie cultivada (*V. rotundifolia*) de gran interés por su resistencia a la filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae*) y otras enfermedades. La mayor parte de las vides cultivadas pertenecen al subgénero *Euvtis* que se divide en tres grandes grupos geográficos: Americano, Asiático y Europeo. El grupo americano engloba unas 20 especies con poca importancia en la vinificación pero con un gran potencial como portainjertos por su resistencia a la filoxera. En este grupo destacan las especies *V. rupestris*, *V. berlandieri* y *V. riparia*. El grupo asiático contiene otra veintena de especies de escasa relevancia en la viticultura actual. El grupo europeo tiene una única especie: *V. vinifera*. La especie *V. vinifera*, representa prácticamente el total de las vides cultivadas para la producción de uva y vinificación en todo el mundo, por sus excelentes cualidades. Sin embargo, es muy sensible a la filoxera y otras enfermedades.

Dentro de la especie *V. vinífera* se conocen varios miles de variedades o cultivares (Chomé, 2002), identificadas en base a caracteres morfológicos (ampelografía) y morfométricos (ampelometría) o marcadores moleculares (O.I.V., 2008). Esta gran variedad se debe a la selección natural y al trabajo humano realizado para adaptar el cultivo a las necesidades de producción. Según datos de la O.I.V. (Organización Internacional de la Vid y el Vino), en España se reconocen 150 variedades de uva y 37 sinonimias, aunque otros autores sostienen que se han reconocido más de 200 variedades de uva y 24 portainjertos (Chomé, 2002). Durante los últimos años la mejora de las variedades se ha realizado mediante procesos de selección clonal y sanitaria, que garantizan un material certificado y de características agronómicas definidas. En Castilla y León se han caracterizado diferentes clones certificados de las nueve principales variedades tradicionales: Albillo Mayor, Albillo Real y Verdejo, entre las blancas y Garnacha Tinta, Juan García, Mencía, Prieto Picudo y Tempranillo (Tinta del País y Tinta de Toro) entre las variedades tintas (Rubio *et al.*, 2009). Para preservar el patrimonio varietal español se han creado colecciones de vid en diferentes puntos geográficos, así por ejemplo el Banco de Germoplasma de la Vid de Castilla y León (BGV-CyL), conserva más de 600 clones de distintas variedades.

De forma tradicional, el viñedo ha estado relegado a zonas con suelo poco productivo, y bajas posibilidades de riego. La vid es una planta que requiere relativamente poca cantidad de agua (Hidalgo, 2002), ya que se estima que precisa entre 280-300 litros para formar un kilo de materia seca. Es un cultivo muy resistente a la sequía debido a que tiene un potente sistema radicular y, de forma general se adapta bien a distintos tipos de suelo. En relación con la temperatura, puede soportar temperaturas de hasta 40 °C durante la fase estival y menores de -10 °C durante el invierno, cuando se encuentra en parada vegetativa. Sin embargo, es muy sensible a las heladas tardías, que ocurren durante o después del periodo de brotación. La vida útil de un viñedo se estima en 30-35 años, aunque esta planta es muy longeva pudiendo superar los 100 años de edad. Debido a las antiguas características de la producción (terrenos pobres, escasa precipitación y cultivo de secano), la formación del viñedo utilizada en gran parte de la geografía española ha sido el

vaso con poda corta. Aunque cada vez son más las plantaciones que usan formas apoyadas o en espaldera con poda larga. Con la espaldera se obtiene una mejor exposición de las hojas a la luz y las aplicaciones de los tratamientos fitosanitarios resultan más eficaces. Además, los sistemas en espaldera mejoran el rendimiento productivo de la vid porque permiten aumentar la densidad de plantación, posibilitan la implantación de sistemas de riego y la mecanización de la vendimia.

i. El cultivo de la vid en España

La extensión mundial del cultivo de la vid se sitúa en torno a los siete millones de hectáreas, distribuidos por los cinco continentes (Tabla I.1). En Europa, la mayor parte del cultivo se encuentra concentrado en los países de la cuenca mediterránea. Según los registros estadísticos de la FAO en el año 2010 la producción total en el mundo fue de 68.311.466 t (Tabla I.1).

Tabla I.1. Superficie cultivada y producción total de vid en el mundo (año 2010). Fuente FAO (2012).

Continente	Superficie cultivada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Europa	3.753.783	26.819.101	7,145
Asia	1.948.512	21.609.450	11,090
América	948.760	13.797.545	14,543
África	350.983	4.203.720	11,977
Oceanía	195.885	1.881.650	9,606
TOTAL MUNDIAL	7.197.923	68.311.466	9,490

De forma general, durante la última década ha disminuido la superficie mundial de vid, pero se ha incrementado la producción total (O.I.V. 2012). Esto se debe en parte a los países emergentes como India, Perú, EEUU, Sudáfrica, Chile, China, Argentina o Australia cuyos rendimientos de producción son elevados (Tabla I.1). De acuerdo con los datos disponibles en el año 2010, España sigue ocupando el primer puesto en superficie cultivada, superando el millón de hectáreas (casi el 14% de la superficie mundial). En nuestro país, la vid representa el cultivo con mayor superficie por detrás de los cereales y el olivar.

En toneladas producidas, España se sitúa en cuarto lugar por detrás de China, Italia y EE.UU, y por delante de Francia (FAO, 2012). Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), correspondientes al año 2010, las zonas vitícolas en España son mayoritariamente de secano (Tabla I.2) (MAGRAMA, 2012a), lo que determina un menor rendimiento en t/ha, comparado con otros países.

Tabla I.2. Resumen anual de la superficie de viñedo en España (año 2010). Fuente MAGRAMA 2012a.

Destino del cultivo	Superficie cultivada (Ha)		
	Secano	Regadío	Total
Vinificación	800.130	184.007	984.137
Uva de mesa	2.374	13.852	16.226
Pasificación	1.707	-	1.707
Viveros	-	140	140
TOTAL	804.211	197.999	1.002.210

En España, el destino principal de la producción es la vinificación (95,6% de la producción), seguido por la producción de uva de mesa, la pasificación y los viveros. Los principales países productores de vino son de mayor a menor Francia, Italia y España (O.I.V., 2012). En la campaña 2010/2011 la producción de vino en nuestro país alcanzó los 35,35 millones de hl (MAGRAMA, 2012a). Desde el año 2008 España es el segundo país exportador de vino, sólo por detrás de Italia. En el año 2011 nuestro país ha incrementado las exportaciones de vino en un 20% alcanzando los 22,309 millones de hl (O.I.V., 2012), por valor de más de 2000 millones de euros, lo que supone un récord histórico para España.

ii. Importancia de la viticultura en Castilla y León

La vid juega un papel muy importante en los sectores económico, social y cultural de muchas regiones de España. Prueba de su importancia es la presencia de este cultivo en todas las comunidades autónomas, existiendo 70 regiones con denominación de origen reconocida en todo el país (MAGRAMA, 2012b). El 46,7% de la superficie total de viñedo de España se encuentra en

Castilla La Mancha. Le siguen en superficie Extremadura, la Comunidad Valenciana y Castilla y León (MAGRAMA, 2012a).

En el año 2010, se han registrado 73.065 ha de viñedo en Castilla y León, de las cuáles el 99,8% se dedicaron a la elaboración de vino. La producción total de uva para vinificación fue de 252.198 t, de las que se obtuvieron casi 1,6 millones de hl de vino (MAGRAMA, 2012a). Con estos datos Castilla y León ocupa el cuarto lugar en superficie cultivada y el sexto lugar en producción de vino dentro del panorama español. Castilla y León es una tierra de vinos de gran calidad. El 87% del volumen de vino producido en 2010 fue comercializado con denominación de origen protegida (DOP) y el 8% con indicación geográfica protegida (IGP).

Castilla y León tiene reconocidas nueve denominaciones de origen: D.O. Ribera del Duero, D.O. Rueda, D.O. Toro, D.O. Bierzo, D.O. Cigales, D.O. Arribes, D.O. Tierra del Vino de Zamora, D.O. Arlanza y D.O. Tierra de León, además de otras figuras de calidad: Vino de Calidad de Sierra de Salamanca, Vino de Calidad de Valtiendas, Vino de Calidad de los Valles de Benavente, o la IGP: Vinos de la Tierra de Castilla y León. La Figura I.1 muestra la situación geográfica de cada una de las DD.OO. de la región.

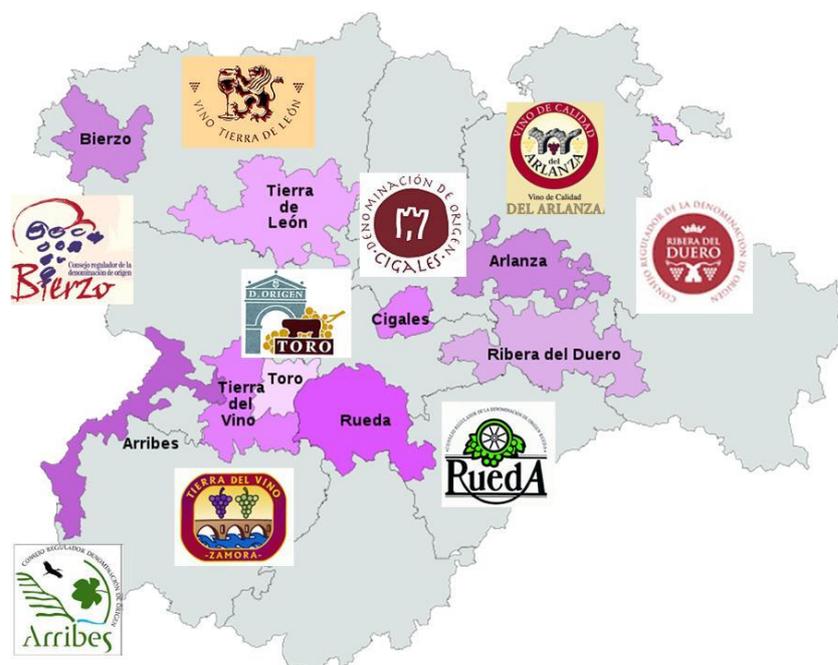


Figura I.1. Mapa geográfico de la superficie de viñedo y sellos de calidad de las nueve denominaciones de origen de Castilla y León.

Entre sus grandes apuestas destacan los tintos de las DD.OO. Arlanza, Ribera de Duero y Tierra del Vino de Zamora elaborados principalmente con uvas de la variedad Tempranillo, o los potentes vinos de la D.O. Toro, elaborados con la reconocida Tinta de Toro (variedad autóctona de Tempranillo). Así como las peculiares características de los tintos elaborados con la variedad Mencía en la D.O. Bierzo, Prieto Picudo en la D.O. Tierra de León o Juan García y Rufete en la D.O. Arribes.

En las denominaciones de origen Cigales y Tierra de León destaca la importante elaboración de vinos rosados, que gozan de un reconocido prestigio internacional.

La variedad de uva blanca con mayor importancia en Castilla y León es sin duda la variedad Verdejo. Esta variedad representa el carácter propio de la D.O. Rueda, que dedica el 99,5% de su producción a la elaboración de vinos blancos. Otras variedades principales de uva blanca reconocidas por los consejos reguladores son: Malvasía, Godello, Albarín blanco, Doña Blanca y Moscatel de grano menudo (Tabla I.3).

Tabla I.3. Principales variedades de vid utilizadas en las DD.OO. de Castilla y León, y tipos de vino elaborados. Fuente: Reglamentos de las DD.OO. y MAGRAMA, 2012b.

D.O.	Variedades principales		Comercialización por tipos de vino		
	Tinta	Blanca	Blanco	Rosado	Tinto
Arlanza	Tempranillo	-	1,9 %	16,2 %	81,9 %
Arribes	Juan García Rufete Tempranillo	Malvasía	9,8 %	4,9 %	85,3 %
Bierzo	Mencía	Godello Doña Blanca	6,7 %	2,8 %	90,5 %
Cigales	Tempranillo Garnacha	Verdejo	0 %	59,8 %	40,2 %
Ribera del Duero	Tempranillo	-	0 %	1,7 %	98,3 %
Rueda	Tempranillo	Verdejo	99,5 %	0,3 %	0,2 %
Tierra de León	Prieto Picudo Mencía	Albarín Blanco Godello Verdejo	1,2 %	66,7 %	32,1 %
Tierra del Vino de Zamora	Tempranillo	Verdejo Malvasía Moscatel de grano menudo	20 %	0 %	80 %
Toro	Tinta de Toro	-	4,6 %	3,6 %	91,8 %

La Tabla I.4 resume los datos más relevantes de cada una de las denominaciones de origen de Castilla y León. Los datos corresponden al informe sobre las denominaciones de origen protegidas de vinos de la campaña 2010/2011 (datos del 1 Agosto de 2010 al 31 de Julio de 2011). Uno de los aspectos a destacar es el reducido tamaño de la superficie media cultivada por cada viticultor. El mantenimiento de los viñedos antiguos de pequeño tamaño, ha sido compatible con la producción de uva de calidad y la implantación de bodegas dotadas con la mejor tecnología. Con el reconocimiento de las denominaciones de origen, el sector vitivinícola ha contribuido al desarrollo rural y a la fijación de la población más joven en los pueblos de Castilla y León.

Tabla I.4. Superficie de viñedo y número de viticultores inscritos al final de la campaña 2010/2011, cálculo de la superficie media por viticultor; comercialización total y valor económico del comercio total en cada DD.OO. de Castilla y León. Fuente (MAGRAMA 2012b). ¹: Entre paréntesis se muestra el número de bodegas inscritas tanto embotelladoras como no embotelladoras. ²: Los guiones indican la no disponibilidad de los datos. En consecuencia la suma del valor total es incompleta (*).

D.O.	Superficie (ha)	Viticultores ¹	Superficie media por viticultor	Comercialización total (hl)	Valor económico (€ del comercio total ²)
Arlanza	447	275 (14)	1,63	3.143	880.046
Arribes	417	363 (13)	1,15	3.539	1.061.700
Bierzo	3.045	2.634 (62)	1,16	73.695	-----
Cigales	2.178	488 (33)	4,46	26.035	10.189.962
Ribera del Duero	21.381	8.356 (286)	2,56	608.254	255.229.078
Rueda	12.590	1.519 (59)	8,29	399.334	-----
Tierra de León	1.329	376 (32)	3,53	12.933	4.103.123
Tierra del Vino de Zamora	702	207 (9)	3,39	997	539.651
Toro	5.676	1.321 (59)	4,30	92.541	23.949.200
TOTAL	47.765	15.539 (567)	3,07	1.220.471	295.952.760(*)

El vino blanco de la D.O. Rueda es el primer caldo español con denominación de origen en volumen de comercialización interior, y el cuarto en comercialización exterior. Mientras el tinto de la D.O. Ribera del Duero ocupa el segundo lugar en comercialización interior de vino tinto en España (MAGRAMA, 2012b).

II. LOS DECAIMIENTOS DE LA VID

Bajo el término “decaimientos de la vid” se incluyen un conjunto de enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera de la vid. La infección fúngica de la madera provoca una pérdida progresiva de vigor, reduciendo la calidad y cantidad de la cosecha, llegando a producir la muerte de parte de la planta, o incluso la planta entera, en un periodo de tiempo indeterminado. La sintomatología de las vides afectadas es diferente según la enfermedad desarrollada, pero también es variable dependiendo de otros factores como las condiciones climáticas y edafológicas. Hasta el punto de que una planta enferma puede mostrar síntomas durante un año y parecer “sana” al año siguiente.

En las dos últimas décadas ha aumentado la incidencia de los decaimientos de la vid, afectando cada vez a plantas más jóvenes. Esta situación ha provocado un interés creciente por investigar la etiología de estas enfermedades. El incremento en la incidencia de las enfermedades fúngicas de la madera se ha asociado con varios factores (Graniti *et al.*, 2000). Uno de éstos factores ha sido la prohibición del arsenito sódico (año 2003 en España), tradicionalmente empleado en el control de la yesca. Otros cambios ocurridos en las prácticas culturales y el manejo del viñedo, como la escasa protección de las heridas de poda, o la transformación de vaso a espaldera, que pueden favorecer la entrada de hongos patógenos también se han relacionado con una mayor incidencia de los decaimientos de la vid.

El establecimiento de numerosas plantaciones nuevas durante la década de los 90, desencadenó una enorme demanda de material de propagación a los viveros comerciales, reemplazando el sistema de injertado tradicional en campo. Se ha demostrado la presencia de hongos asociados a los decaimientos de la vid durante el proceso de producción de plantas en los viveros de Nueva Zelanda (Ridgway *et al.*, 2002), Sudáfrica (Fourie & Halleen, 2004a), Italia (Zanzotto *et al.*, 2007), y España (Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2010). La insuficiente legislación que regula la sanidad de las plantas procedentes de los viveros, junto con una carencia en las metodologías de detección disminuye la calidad sanitaria de las explotaciones jóvenes.

Los decaimientos de la vid están causados por un elevado número de especies fúngicas, que ha ido aumentando con el avance de las investigaciones. Estos hongos se agrupan en una serie de enfermedades con síntomas más o menos definidos. Sin embargo, varias enfermedades pueden ocurrir simultáneamente en una misma planta, provocando una sintomatología múltiple, a veces confusa. Incluso unas enfermedades pueden ser precursoras de otras en la misma planta (Mugnai *et al.*, 1999). A continuación se detallan las principales enfermedades que constituyen los decaimientos de la vid.

i. Pie negro

La enfermedad del pie negro está causada por especies del género *Cylindrocarpon*, ocurre mayoritariamente en plantas jóvenes y fue descrita por primera vez en Francia en 1961 (Maluta & Larignon, 1991). Durante las dos últimas décadas, coincidiendo con la muerte progresiva de plantas jóvenes de vid, esta enfermedad ha sido investigada en diferentes regiones productoras del mundo (Rego *et al.*, 2000; Fourie & Halleen, 2004a; Petit & Gubler, 2005; Halleen *et al.*, 2006a y b; Dubrovsky & Fabritius, 2007; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007). También en España, dónde se ha constatado la presencia *C. macrodidymum* y *C. liriodendri* en plantas jóvenes con pie negro (Alaniz *et al.*, 2007).

a. Sintomatología

Las plantas de vid con pie negro muestran un retraso en su desarrollo, follaje escaso, hojas cloróticas y entrenudos más cortos. El escaso vigor impide en ocasiones la brotación de yemas o partes de la planta (Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2006a; Alaniz *et al.*, 2007). La infección ocurre en las raíces y cuello de la planta, dónde aparecen zonas oscuras y partes necrosadas (Figura II.1. A). Estas lesiones en la base del portainjerto han dado a la enfermedad el nombre de pie negro. A veces se observan dos niveles radiculares, uno poco profundo que queda por encima de otro totalmente necrosado (Halleen *et al.*, 2004). En cortes longitudinales del portainjerto se aprecian necrosis de los vasos desde la raíz hacia la parte superior (Figura II.1. E). En cortes

transversales las lesiones necróticas se observan desde la corteza hacia la médula (Alaniz, 2008).

b. Etiología y taxonomía

Las dos primeras especies asociadas con el pie negro de la vid fueron *C. destructans* (Maluta & Larignon, 1991) y *C. obtusisporium* (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975). Halleen *et al.* (2004) describieron una nueva especie: *C. macrodidymum*. Posteriormente los aislados de *C. destructans* procedentes de vid fueron reclasificados con el nombre de *C. liriodendri* (Halleen *et al.* 2006a), en base a las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico y el gen de la β -tubulina. Sin embargo, se mantuvo el nombre de *C. destructans* para aislados procedentes de otros hospedadores. Una nueva especie asociada a la vid, *C. pauciseptatum*, ha sido descrita en Eslovenia y Nueva Zelanda (Schroers *et al.*, 2008). En inoculaciones sobre material vegetal de vid con *C. macrodidymum*, *C. liriodendri* (Alaniz *et al.*, 2007) y *C. pauciseptatum* (Martín *et al.*, 2011), se han desarrollado síntomas similares a los descritos anteriormente.

El género *Cylindrocarpon* pertenece al grupo de los hongos mitospóricos; taxonómicamente, se ubica dentro de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae. Su forma sexual o teleomorfo se atribuía hasta hace poco al género *Neonectria*. Recientemente se ha revisado la correspondencia *Cylindrocarpon-Neonectria* mediante estudios morfológicos y moleculares (Chaverri *et al.*, 2011). Estos análisis moleculares se han basado en la secuenciación y construcción filogenética de diferentes genes como la actina, el factor de elongación, la β -tubulina, la RNA polimerasa, los genes ribosomales (LSU) y las regiones existentes entre los genes ribosomales (ITS). Los aislados estudiados, procedentes de diferentes hospedadores, se reclasificaron en cinco géneros, algunos de ellos nuevos. Como resultado de ese trabajo, *C. destructans*, *C. macrodidymum* y *C. liriodendri* han pasado a formar parte del género *Ilyonectria* (Chaverri *et al.*, 2011).

En la actualidad varios grupos de investigación están trabajando para esclarecer la correcta identificación de *Ilyonectria* spp. asociados al pie negro.

La caracterización morfológica y cultural, junto con el análisis múltiple de genes (β -tubulina, histona H3, factor de elongación 1- α e ITS) han sido utilizados para estudiar diferentes colecciones internacionales de aislados del género *Cylindrocarpon* asociados con el pie negro. Los resultados obtenidos han mostrando la existencia de nuevas especies del género *Ilyonectria* asociadas a los decaimientos de la vid y han determinado que el tamaño de los conidios y la secuencia de la histona H3 son los caracteres más informativos para diferenciar las especies de *Ilyonectria* (Cabral *et al.*, 2012a y b).

Existe otro género asociado al pie negro de la vid que ha sido aislado con menos frecuencia y restringido a algunas zonas vitícolas: *Campylocarpon*, con las especies *Campylocarpon fasciculare* y *Campylocarpon pseudofasciculare* (Halleen *et al.*, 2004). Recientemente *Campylocarpon fasciculare* ha sido detectado por primera vez en Europa y España (Alaniz *et al.*, 2011a).

c. Descripción morfológica de *Cylindrocarpon*

Los aislados del género *Cylindrocarpon* asociados al pie negro presentan una gran variabilidad morfológica, las colonias muestran diferentes colores (blancas, beiges, naranjas y marrones) y texturas, el micelio puede ser ralo u algodonoso (Figura II.1. C). Los conidióforos presentan microconidios y macroconidios. Los microconidios son subcilíndricos u ovoides y no suelen estar septados. Los macroconidios son predominantes, pueden ser rectos o ligeramente curvados, con los extremos redondeados y con 1 a 3 septos (Halleen *et al.*, 2004 y 2006a). También puede formar clamidosporas, originadas en el micelio o los macroconidios. Las clamidosporas son hialinas a marrones, globosas y pueden estar aisladas o agrupadas (Alaniz, 2008; Schroers *et al.*, 2008). En la Figura II.1. (B y D) se aprecia la forma y tamaño de los macroconidios y las clamidosporas del género *Cylindrocarpon*.

ii. Enfermedad de Petri

La enfermedad de Petri, recibe el nombre del primer investigador que describió los síntomas típicos de esta enfermedad (Petri, 1912), aunque ha sido referenciada con otros nombres “black goo”, “grapevine decline” o “yesca joven” en la literatura (Morton, 2000; Rego *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2001).

Esta enfermedad ocurre principalmente en plantas jóvenes, y causa importantes pérdidas económicas en las nuevas plantaciones de todo el mundo (Scheck *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Rumbos & Rumbou, 2001; Edwards *et al.*, 2001; Gatica *et al.*, 2001; Giménez-Jaime *et al.*, 2006).

a. Sintomatología

Las plantas afectadas por la enfermedad de Petri, muestran un menor crecimiento y desarrollo foliar, con hojas pequeñas, cloróticas y a veces necrosadas. Se observan entrenudos cortos y brotaciones raquílicas, en ocasiones no llegan ni a brotar. Estos síntomas son muy generales y pueden fácilmente confundirse con los producidos por la enfermedad de pie negro. Pero los síntomas típicos, descritos por L. Petri en 1912, que se desarrollan en el interior de la madera difieren de los observados en el pie negro. En los cortes transversales aparecen punteaduras de coloración oscura, generalmente agrupadas en forma de anillo alrededor de la médula (Figura II.2. A). En los cortes longitudinales se observan los vasos necrotizados, dispuestos en forma de estrías paralelas a la médula. Con el tiempo los elementos vasculares pueden emitir una exudación gomosa de color negro (Figura II.2. A), que actúa de mecanismo de defensa frente a la invasión de los hongos. Estos síntomas son más acentuados en el portainjerto pero aparecen también en la zona del injerto y la madera de la variedad.

b. Etiología y taxonomía

El hongo *Phaeomoniella chlamydospora* y diferentes especies del género *Phaeoacremonium* (*Pm.*) han sido descritos como agentes causales de la enfermedad de Petri (Larignon & Dubos, 1997; Edwards & Pascoe, 2004; Mostert *et al.*, 2006a; Gramaje *et al.*, 2009a). Estudios de patogenicidad han demostrado el desarrollo de diferentes síntomas descritos anteriormente al inocular material vegetal de vid con algunos de estos patógenos (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007; Aroca & Raposo, 2009; Gramaje *et al.*, 2010a).

El género *Phaeoacremonium* pertenece a la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Calosphaeriales y familia Calosphaeriaceae y se ubica dentro del grupo de hongos mitospóricos. Fue descrito en 1996 (Crous *et al.*,

1996). Inicialmente integraba seis especies *Pm. aleophilum*, *Pm. angustus*, *Pm. chlamydosporum*, *Pm. inflatipes*, *Pm. parasiticum* y *Pm. rubrigenum*. Posteriormente la especie *Pm. chlamydosporum* fue reclasificada en un nuevo género: *Phaeomoniella* (*Pa.*) (Crous & Gams, 2000) adoptando el nombre actual (*Phaeomoniella chlamydospora*). La forma sexual del género *Phaeomoniella* no se conoce.

Las especies del género *Phaeoacremonium* tienen distribución mundial y presentan un amplio rango de hospedadores, incluido el ser humano (Guarro *et al.*, 2003; Mostert *et al.*, 2005). Hasta la fecha se han descrito 25 especies de *Phaeoacremonium* asociadas a los decaimientos de la vid (Crous *et al.*, 1996; Dupont *et al.*, 2000; Groenewald *et al.*, 2001; Mostert *et al.*, 2005; Mostert *et al.*, 2006b; Damm *et al.*, 2008; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009b; Graham *et al.*, 2009). Un total de 11 especies de *Phaeoacremonium* han sido detectadas en vides de España (Aroca *et al.*, 2006 y 2007; Martín & Cobos, 2007; Gramaje *et al.*, 2007; 2008, 2009a y 2009b; P. Benavides, comunicación personal, 2011). La especie más frecuente y abundante asociada con los decaimientos de la vid en todo el mundo es *Pm. aleophilum* (Mostert *et al.*, 2006a y b, Martín & Cobos, 2007; Essakhi *et al.*, 2008). El teleomorfo del género *Phaeoacremonium* es *Togninia* (Mostert *et al.*, 2003). Sin embargo todavía no se conoce la forma sexual de todas las especies de *Phaeoacremonium* (Tabla II.1).

c. Descripción morfológica de los hongos implicados

Morfológicamente la especie *Pa. chlamydospora* se caracteriza por presentar una coloración verdosa más o menos clara con borde blanquecino. *Pa. chlamydospora* produce conidios elipsoides de 3-4 µm de longitud y 1-1,5 µm de anchura, en conidióforos libres (Crous *et al.*, 2006). Transcurrido más de un mes, también produce clamidosporas características de la especie.

Las especies del género *Phaeoacremonium* presentan una gran variabilidad en la coloración de las colonias, que van desde los tonos beige, o gris ocre (ej. *Pm. aleophilum*) a los violáceos y rojizos (ej. *Pm. viticola*), pasando por distintas tonalidades de color marrón (ej. *Pm. parasiticum*) (Figura II.2. B, C y D). La textura del micelio es mayoritariamente verrugosa, siendo

las verrugas muy prominentes en algunas especies (de 3 μm en *Pm. parasiticum*).

Tabla II.1. Número y nomenclatura de las especies conocidas del género *Phaeoacremonium* y su teleomorfo *Togninia*. Especies aisladas en plantas de vid y especies identificadas hasta el momento en España.

Anamorfo	Telomorfos conocidos	Presente en <i>Vitis vinifera</i>	Identificado en España
<i>Pm. aleophilum</i>	<i>T. minima</i>	si	si
<i>Pm. angustius</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. inflatipes</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. parasiticum</i>	<i>T. parasitica</i>	si	si
<i>Pm. rubrigenum</i>	<i>T. rubrigena</i>	si	no
<i>Pm. viticola</i>	<i>T. viticola</i>	si	si
<i>Pm. mortoniae</i>	<i>T. fraxinopennsylvanica</i>	si	si
<i>Pm. australiense</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. krajdenii</i>	<i>T. krajdenii</i>	si	no
<i>Pm. subulatum</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. scolyti</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. venezuelense</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. alvesii</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. amstelodamense</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. tardicrescens</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. griseorubrum</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. iranianum</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. austroafricanum</i>	<i>T. austroafricana</i>	si	no
<i>Pm. novae-zealandiae</i>	<i>T. novae-zealandiae</i>	no	no
<i>Pm. sphinctrophorum</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. theobromatis</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. argentinensi</i>	<i>T. argentinensis</i>	no	no
Desconocido	<i>T. incospicua</i>	no	no
<i>Pm. pallidum</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. prunicolum</i>	Desconocido	no	no
<i>Pm. fuscum</i>	Desconocido	no	no
Desconocido	<i>T. africana</i>	no	no
Desconocido	<i>T. griseo-olivacea</i>	no	no
<i>Pm. croatiense</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. hungaricum</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. sicilianum</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. tuscanum</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. cinereum</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. hispanicum</i>	Desconocido	si	si
<i>Pm. armeniacum</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. globusum</i>	Desconocido	si	no
<i>Pm. occidentale</i>	Desconocido	si	no
TOTAL: 34	12	25	11

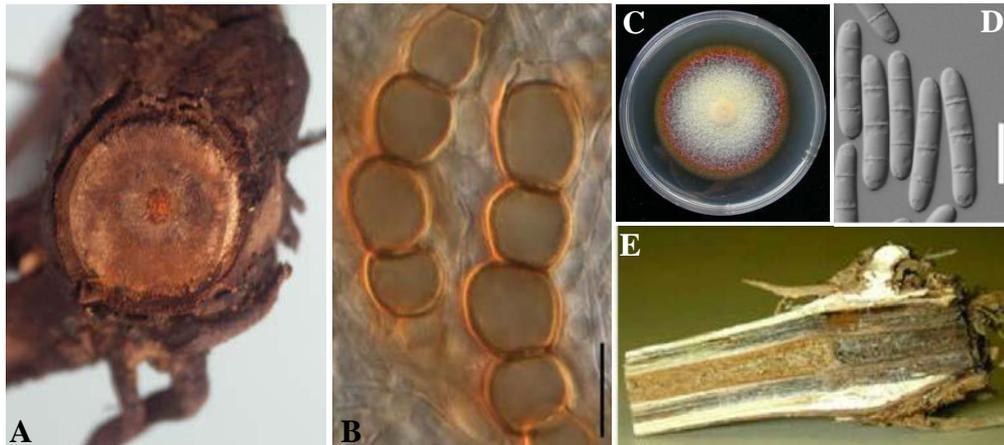


Figura II.1. Pie negro. A: Zonas oscuras y necrosadas en la base del portainjerto (Alaniz, 2008). B: Clamidosporas de *C. liriodendri* (Halleen *et al.*, 2006a. Barra 15 μ m). C: Micelio de *C. macrodidymum* en PDA (Alaniz, 2008. Aislado Cy62). D: Macroconidios de *C. pauciseptatum* (Schroers *et al.*, 2008. Barra 20 μ m). E: Zonas necrosadas en sección longitudinal (Halleen *et al.*, 2004).

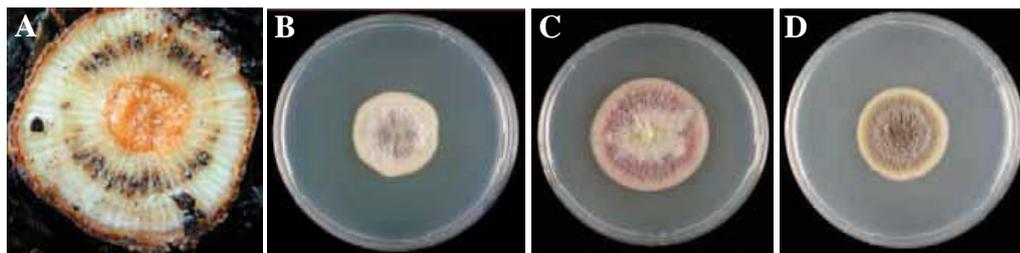


Figura II.2. Enfermedad de Petri. A: Punteaduras de coloración oscura con exudación gomosa en el portainjerto de vid de un año (Mostert *et al.*, 2006b). B: Micelio de *Pm. aleophilum* en medio PDA (Mostert *et al.*, 2006b). C: Micelio de *Pm. viticola* en medio MEA (Mostert *et al.*, 2006b) D: Micelio de *Pm. parasiticum* en medio PDA (Mostert *et al.*, 2006b).

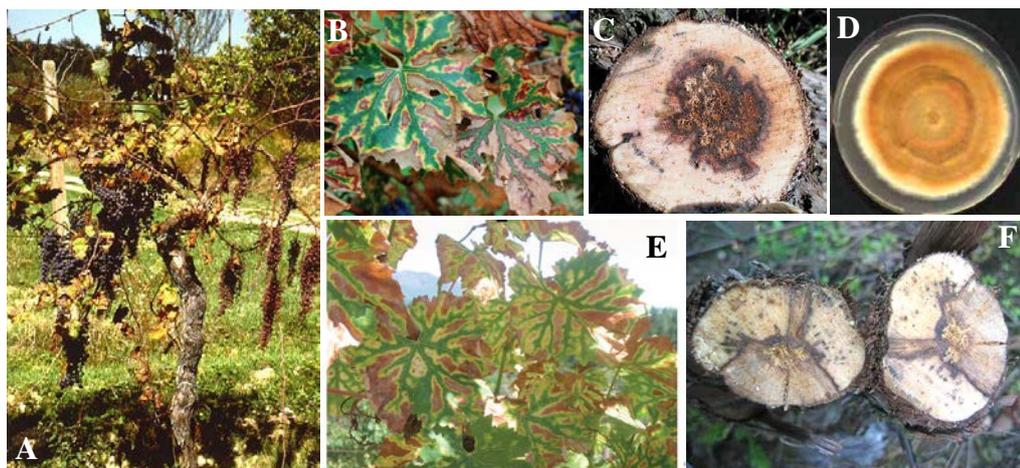


Figura II.3. Yesca. A: Planta con síntomas de apoplejía (Mugnai *et al.*, 1999) B: Síntomas foliares de yesca (Surico *et al.*, 2006). C: Síntomas de degradación de la madera afectada por yesca (Essakhi *et al.*, 2008). D: Micelio de *F. mediterranea* después de tres semanas (Fischer, 2006). E: Síntomas foliares de yesca (White *et al.*, 2011). F: Síntomas de degradación de la madera afectada por yesca (Larignon *et al.*, 2009).

A diferencia de *Pa. chlamydospora* las especies del género *Phaeoacremonium* no producen clamidosporas. Presentan fiálides de tres tamaños diferentes, y conidióforos que pueden o no estar ramificados (Mostert *et al.*, 2005).

Los caracteres morfológicos más útiles en la diferenciación de *Phaeoacremonium* spp. son la morfología de los conidióforos, el tipo y forma de las fiálides, y el tamaño y tipo de los conidios. Los conidios son mayoritariamente cilíndricos, oblongos u elipsoidales, ocasionalmente reniformes o más alargados (6-4 μm de longitud y 2-1 μm de anchura). La relación entre la longitud y anchura de los conidios difiere entre especies. Otros caracteres importantes son el crecimiento radial y la temperatura máxima de crecimiento en medio MEA. Así como la producción o no de una pigmentación amarilla que tiñe los medios PDA (Agar Patata Dextrosa) y OA (Agar Harina de Avena) (Mostert *et al.*, 2005 y 2006b). Se ha creado una clave electrónica de identificación (<http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium>) que incluye todos estos caracteres morfológicos y la secuencia del gen de la β -tubulina, permitiendo diferenciar las especies del género *Phaeoacremonium* (Mostert *et al.*, 2005).

iii. Yesca

La yesca afecta principalmente a plantas adultas, es una de las enfermedades conocidas de la vid desde más antiguo. Su nomenclatura deriva de la antigua utilización de la madera afectada (blanda y esponjosa) para hacer fuego. Se ha convertido en un problema muy importante en todas las zonas vitivinícolas del mundo (Larignon, 2004), especialmente desde la prohibición del uso del arsenito sódico (Surico *et al.*, 2006). La expresión de los síntomas puede ocurrir en dos formas distintas: una forma lenta o crónica y una forma rápida conocida como apoplejía.

a. Sintomatología

En las hojas de las plantas afectadas se observan decoloraciones y necrosis internerviales de color amarillo o pardo en las variedades de uva blanca y de color rojizo en las tintas (Fig III.3 B y C). Esta sintomatología

ocurre después de la floración, durante el verano (en los estadios fenológicos M y N) y comienza por las hojas basales de las ramas, que terminan por caer, extendiéndose luego al resto de la planta. Estos síntomas pueden variar de un año a otro en la misma planta manifestándose de forma crónica o errática (Di Marco *et al.*, 2000).

La forma rápida o apopléjica suele aparecer a mediados de verano y consiste en una muerte súbita de la planta que ocurre en pocos días. Las hojas del extremo de los sarmientos comienzan a tomar una coloración verde grisácea y la planta acaba secándose totalmente con las hojas unidas al sarmiento. El marchitamiento brusco de las plantas, ocurre generalmente sin ningún síntoma previo. Se debe a un drástico desequilibrio hídrico, por las dificultades en la circulación de la savia. Esta muerte rápida ocurre con mayor frecuencia en terrenos arcillosos, profundos y frescos, y se relaciona con la sucesión de tormentas y elevadas temperaturas (Figura II.3 A).

A veces aparecen síntomas también en las bayas, consisten en unos puntos de color violeta oscura, denominados *black measles*, que se desarrollan en la epidermis. Los frutos afectados pueden mantenerse turgentes hasta la maduración, o desecarse y colapsar (Mugnai *et al.*, 1999).

En el interior de la madera de las plantas afectadas por yesca se observa una degradación progresiva de la madera. Aparecen zonas necrosadas de color oscuro y una podredumbre seca y esponjosa de color amarillo claro en el centro (Figura II.3 E).

b. Etiología y taxonomía

La producción esponjosa de la madera que aparece en las plantas con yesca se asocia a la presencia de los hongos basidiomicetos *Fomitiporia mediterranea*, y *Stereum hirsutum* en menor medida. Aunque en la actualidad se reconoce también la participación de los patógenos *Pa. chlamydospora* y distintas especies del género *Phaeoacremonium*. La reproducción de los síntomas típicos de yesca mediante inoculación de los agentes causales no ha sido siempre exitosa (Laveau *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010a). La yesca es una enfermedad compleja y aunque se conocen los agentes causales todavía no se conoce con exactitud el proceso de infección o los factores que influyen en

el desarrollo de la enfermedad (Surico *et al.*, 2006). Larignon y Dubos (1997) desarrollaron una hipótesis proponiendo que la yesca es consecuencia de una sucesión de hongos. *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. serían los pioneros en infectar la planta, favoreciendo la posterior infección y colonización de *F. mediterranea* y *S. hirsutum*. Así algunos autores diferencian entre yesca joven cuando se observan síntomas foliares y pequeñas necrosis en la madera; o yesca propiamente dicha cuando aparecen pudriciones esponjosas en la madera ocasionadas por *F. mediterranea* y en algunos casos *S. hirsutum* (Surico *et al.*, 2006).

Fomitiporia mediterranea pertenece a la división Basidiomycota, clase Agaromycetes, orden Hymenochaetales, familia Hymenochaetaceae. Originalmente era conocido como *Phellinus igniarius* en Italia, y como *Phellinus punctatus* en Francia. El género *Fomitiporia* (F.) fue designado en 1996 (Fischer, 1996). Estudios posteriores asociaron la especie *F. punctata* con los síntomas de yesca en Europa (Mugnai *et al.*, 1999) y en la actualidad recibe el nombre de *F. mediterranea* (Fischer, 2002). Otras especies del género han sido asociadas con los síntomas de yesca (ej. *F. polymorpha*, *F. australiensis*) pero no en Europa (Fischer, 2006).

Stereum hirsutum pertenece a la división Basidiomycota, clase Agaromycetes, orden Russulales, familia Stereaceae. Este hongo se considera una especie saprófita que crece formando carpóforos externos sobre la madera viva o muerta de especies arbóreas. *Stereum hirsutum* ha sido aislado de plantas con síntomas de yesca, pero siempre con baja frecuencia (Larignon & Dubos, 1997; Armengol *et al.*, 2001; Martín & Cobos, 2007; Sánchez-Torres *et al.*, 2008). Los carpóforos de *S. hirsutum* han sido detectados en plantas de vid con y sin síntomas de yesca. Sin embargo, inoculaciones de vid con *S. hirsutum* no han mostrado los síntomas de esta enfermedad ni en hojas ni bayas (Reisenzein *et al.*, 2000). En la actualidad no se considera que *S. hirsutum* tenga una implicación importante en la yesca.

c. Descripción morfológica de los hongos implicados

La descripción de los hongos pioneros *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. ha sido abordada en el apartado anterior.

F. mediterranea tiene un micelio de color blanco que al envejecer se vuelve amarillo y algodonoso en medio PDA (Figura II.3 D). Las basidiosporas son hialinas, lisas y globulosas de 6-7 x 5-6 μm (Fischer, 2002), aunque no se producen en medio de cultivo (Dubos, 2002). Puede formar carpóforos en los troncos de vid, que se muestran como almohadillas irregulares de un centímetro de diámetro y color amarillento, con poros circulares en su desarrollo.

S. hirsutum muestra un micelio de color blanco que se torna ocre al envejecer en medio PDA. Presenta hifas tabicadas que pueden formar puentes de comunicación entre células adyacentes. Las basidiosporas son hialinas elipsoidales a cilíndricas de 5-7,5 x 2,5-3 μm que solo parecen producirse en medio natural. Los carpóforos son de color naranja a marrón claro, variando en el tamaño.

iv. Eutipiosis

La eutipiosis es una enfermedad crónica de la madera de vid con gran poder destructivo. Generalmente afecta a plantas adultas, y raramente ocurre en plantas menores de ocho años. Ha sido citada en muchas regiones productoras de vid en el mundo, causando importantes pérdidas (Wicks & Hall, 1997; Trouillas *et al.*, 2001; Péros & Berger, 2003). En España fue diagnosticada por primera vez en Badajoz, en 1979; y actualmente esta afección ha sido detectada con frecuencia en Castilla y León y la Rioja Alavesa (Martín & Cobos, 2007; Muruamendiaraz *et al.*, 2007). La incidencia de eutipiosis parece ser mayor en regiones con abundante pluviometría, superior a 600 mm anuales (Dubos, 2002).

a. Sintomatología

Los síntomas externos se hacen evidentes en los estadios E y F desde finales de mayo a junio. Las plantas afectadas muestran pámpanos débiles, con entrenudos cortos y hojas pequeñas, deformadas, cloróticas y con necrosis marginales (Figura II.4 A). Con frecuencia se observan racimos abortados. Estos síntomas se observan hasta finales de la primavera, volviéndose más acentuados cada año hasta que finalmente parte o todo el brazo deja de brotar.

Los síntomas aéreos se relacionan con los observados en la madera de las plantas afectadas, mediante la presencia de un chancro, con frecuencia asociado a heridas de poda. La madera afectada toma un color marrón oscuro, habitualmente en forma de “V”, que recorre el xilema desde la parte externa, dónde se sitúa el chancro, hacia la médula (Figura II.4. B). Esta necrosis sectorial, a diferencia de la yesca, es de consistencia dura.

b. Etiología y taxonomía

En la bibliografía se reconoce a *Eutypa lata* como el hongo causal de la eutipiosis (Carter, 1976; Carter, 1991; Lardner *et al.*, 2005). En California, se ha demostrado la patogenicidad de otra especie: *Eutypa leptoplaca*, inoculando plantas de vid (Trouillas & Gubler, 2004). Las ascosporas de *Eutypa* permanecen en los peritecios que se desarrollan en los chancros de la vid. Con la llegada de las lluvias en primavera, las ascosporas son expulsadas de los peritecios y diseminadas por el aire, infectando otras plantas a través de las heridas. Uno de los problemas que se plantea en el estudio de la eutipiosis es el lento desarrollo de la enfermedad. Los síntomas no se manifiestan hasta dos años después de ocurrida la infección, siendo más evidentes a los tres o cuatro años. Pueden pasar varios años desde que se produce la infección hasta que ocurre la muerte del brazo afectado, o incluso de la planta entera (Dubos, 2002).

El género *Eutypa* se clasifica taxonómicamente en la división *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Xylariales*, familia *Diatrypaceae*. *Eutypa lata* es un hongo mitospórico, la forma sexual recibe el nombre de *Libertella blepharis* y afecta también a otras plantas leñosas.

c. Descripción morfológica de *Eutypa lata*

En medio de cultivo, *E. lata* presenta un micelio blanco aéreo que al envejecer se torna de color gris. La formación de conidios, útiles en la identificación no se produce siempre en condiciones *in vitro* (Carter, 1991). Las ascosporas de *E. lata* son de color amarillo pálido algo curvadas. Su tamaño es de 6,5-11 x 1,8-2 μm y se producen en ascas de 30-60 x 5-7,5 μm que tienen un

poro apical (Figura II.4 C). Las ascosporas necesitan una humedad relativa elevada para germinar y su temperatura óptima de germinación es 20-25 °C.

v. Brazo muerto

El brazo muerto, del inglés “black dead arm (BDA)”, es una enfermedad de la madera de la vid que se manifiesta por lo general en plantas adultas. Fue descrita por primera vez en Hungría en 1974 (Lehoczky, 1974) y citada posteriormente en Italia (Cristinzio, 1978), Francia (Larignon *et al.*, 2001; Lecomte *et al.*, 2005), y otros países (Dubos, 2002; Auger *et al.*, 2004). El aumento de la enfermedad se ha asociado con los cambios en los sistemas de conducción (Lehoczky, 1996).

a. Sintomatología

Los síntomas externos del BDA comienzan a expresarse en primavera y se manifiestan durante todo el ciclo. Las hojas de las plantas afectadas muestran manchas foliares y necrosis similares a los desarrollados en plantas con yesca (Lecomte *et al.*, 2005; Surico *et al.*, 2006), aunque en este caso las hojas nunca muestran decoloraciones amarillentas (Larignon *et al.*, 2001) (Figura II.5 A y B). Posteriormente las hojas se desecan, y caen al suelo, pudiendo quedar alguna en el extremo apical de la rama. Los síntomas se inician en las hojas basales de las ramas y luego se extienden al resto. Esta patología también puede afectar a las inflorescencias y los frutos, que se marchitan.

Las cepas afectadas por BDA se caracterizan por presentar una necrosis de color marrón, que se extiende longitudinalmente por brazos y tronco (Figura II.5 C). En ocasiones esta necrosis puede observarse desde el exterior, porque la corteza aparece suelta y se puede separar fácilmente con la mano (Lecomte *et al.*, 2005). En cortes transversales de la madera se observan necrosis sectoriales de color oscuro y consistencia dura. Este síntoma es muy similar al observado en plantas afectadas por eutipiosis. Así, algunos resultados han demostrado la dificultad de diferenciar los síntomas de eutipiosis y BDA en plantas muestreadas en el mes de junio (Luque *et al.*, 2009).

b. Etiología y taxonomía

La enfermedad de brazo muerto se ha relacionado con el aislamiento de distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae (Lehoczky, 1974; Cristinzio, 1978; Larignon *et al.*, 2001). Las especies de esta familia tienen una distribución cosmopolita (Denman *et al.*, 2000) y, además de la vid, son causantes de decaimientos en muchas plantas leñosas (Denman *et al.*, 2003; Pavlic *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2004).

En la actualidad el aislamiento de las especies de la familia Botryosphaeriaceae en vid se relaciona con numerosos síntomas no específicos ya descritos para otras enfermedades de la madera (van Niekerk *et al.*, 2006) (Figura II.5 D, E y F). Diferentes trabajos han demostrado la presencia de especies de la familia Botryosphaeriaceae en plantas afectadas por yesca (Mugnai *et al.*, 1999; Armengol *et al.*, 2001; Fischer & Kassemeyer, 2003; Martín & Cobos, 2007), excoriosis (Phillips, 1998 y 2002), eutipiosis (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Martín & Cobos, 2007; Luque *et al.*, 2009) y otras enfermedades de decaimiento de la vid (ej. “*Botryosphaeria canker*” o “*Diplodia cane dieback*”). Así mismo especies de Botryosphaeriaceae han sido detectadas en plantas jóvenes que mostraron fallos en la zona del injerto (Phillips, 2002). Recientemente se ha propuesto utilizar el nombre de “*Botryosphaeria dieback*” para describir las diferentes enfermedades de los decaimientos de la vid con síntomas causados por especies de la familia Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres, 2011).

Sin embargo, los resultados obtenidos al llevar a cabo ensayos de patogenicidad sobre material vegetal de vid han sido contradictorios (Úrbez-Torres, 2011), encontrándose diferentes grados de virulencia y lesiones vasculares (Phillips, 1998 y 2002; van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Laveau *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2009). En ocasiones, algunas especies de Botryosphaeriaceae se han considerado patógenos débiles o latentes (Phillips, 1998), hongos endófitos (González & Tello, 2011), o simplemente saprófitos (Taylor *et al.*, 2005). De hecho, Botryosphaeriaceae spp. también ha sido aislado con frecuencia a partir de material vegetal de viveros (Fourie & Halleen, 2004a; Aroca *et al.*, 2010) y plantas sin síntomas (Casieri *et al.*, 2009; González & Tello, 2011).

Taxonómicamente la familia Botryosphaeriaceae pertenece a la división Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Botryosphaeriales. Son hongos mitospóricos con una fase anamórfica y otra teleomórfica o sexual (Denman *et al.*, 2000). La identificación morfológica de las especies de Botryosphaeriaceae se basa principalmente en características del anamorfo, debido a la escasez de teleomorfos en la naturaleza. Pero la taxonomía morfológica de los géneros anamórficos puede resultar confusa, debido a las variaciones observadas entre hospedadores, o limitada porque no permite diferenciar todas las especies.

Estudios taxonómicos basados en la comparación de secuencias y apoyados en caracteres morfológicos revelaron que podían diferenciarse dos grupos, especies con anamorfo tipo *Diplodia* y especies con anamorfo tipo *Fusicoccum* (Jacobs & Rehner, 1998; Denman *et al.*, 2000; Phillips, 2002; Slippers *et al.*, 2004). Posteriormente, Phillips *et al.* (2005) incorporaron un nuevo grupo con especies que poseen anamorfo del tipo *Dothiorella*. En 2006, Crous *et al.* definieron un nuevo género anamórfico llamado *Neofusicoccum*. Revisiones taxonómicas más recientes han establecido 11 clados para clasificar las especies de la familia Botryosphaeriaceae (Phillips *et al.* 2008).

El número de Botryosphaeriaceae spp. asociadas con los decaimientos de la vid ha ido incrementándose a lo largo de los años debido a las numerosas revisiones taxonómicas y a la descripción de nuevas especies (van Niekerk *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2005). En su revisión Úrbez-Torres (2011) enumera hasta 21 especies de Botryosphaeriaceae que han sido asociadas a los decaimientos de la vid. La correlación entre anamorfo y teleomorfo no es conocida para todas las especies. Los géneros con mayor frecuencia relacionados con los decaimientos de la vid son: *Diplodia* (Di.), *Dothiorella* (Do.), *Botryosphaeria* (B.), *Lasiodiplodia* (L.) y *Neofusicoccum* (N.).

c. Descripción morfológica de Botryosphaeriaceae

De forma generalizada las especies de la familia Botryosphaeriaceae presentan un crecimiento rápido en medio de cultivo (5-10 mm/día). El micelio presenta inicialmente una coloración blanquizca que rápidamente adquiere una tonalidad marrón-grisácea conformando un micelio aéreo bastante denso.

El género *Diplodia* se caracteriza por tener conidios cilíndricos, generalmente hialinos, aunque pueden pigmentarse y a veces septarse en la madurez. Los conidios de *Diplodia* tienen pared gruesa y ancho superior a 10 μm (Phillips, 2002). En la especie *Di. seriata* la superficie de los conidios se muestra rugosa en la cara interna y los conidios son de color marrón en la madurez (Figura II.5 G), mientras en la especie *Di. mutila* los conidios son lisos y permanecen hialinos durante más tiempo, algunos con una gran gútula central (Alves *et al.*, 2004). Las ascosporas del género *Diplodia* son hialinas y aseptadas.

El género *Lasiodiplodia* tiene conidios similares a los de *Diplodia*, inicialmente hialinos y aseptados. Con el tiempo se tornan de color marrón y aparecen septos. Se caracterizan por presentar estrías u ornamentaciones debido al depósito de gránulos de melanina en la pared (Pavlic *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). La especie tipo del género *Lasiodiplodia* es *L. theobromae* y presenta conidios uniseptados con un tamaño de 21-31 x 13-15 μm (Alves *et al.*, 2008) (Figura II.5 H e I).

El género *Botryosphaeria* (anamorfo tipo *Fusicoccum*) fue caracterizado inicialmente por presentar conidios hialinos, de fusiformes a elípticos, de pared delgada, normalmente septados y de ancho inferior a 10 μm (Phillips, 2002). Los conidios de *B. dothidea* son unicelulares, hialinos, fusiformes, lisos con contenido granular y de tamaño 18-20 x 4-5 μm (Figura II.5 J). Las ascosporas son hialinas, ovoides a veces con los extremos cónicos en forma de huso, lisas con contenido granular y aparecen biseriadas en las ascas (Slippers *et al.*, 2004).

El género *Neofusicoccum* presenta conidios globosos a piriformes, de color marrón, débilmente verrugosos y septados. La especie *N. parvum* se caracteriza por tener conidios elipsoidales, hialinos que se oscurecen posteriormente, con pared fina, inicialmente aseptados que desarrollan 1-2 septos antes de la germinación y de tamaño 15-20 x 4,5-6 μm (Figura II.5 K). Las ascosporas son hialinas y aseptadas al principio y después marrón claro con 1 o 2 septos de tamaño 18-27 x 8-11 μm (Crous *et al.*, 2006).

El género *Dothiorella* (teleomorfo *Dothidotia*), en contraste con el resto de especies de Botryosphaeriaceae, presenta diferencias más aparentes en la

forma teleomórfica. A diferencia de otros géneros, las ascosporas son oscuras y uniseptadas (Crous *et al.*, 2006). La especie *Do. sarmentorum* presenta ascosporas oblongas u ovoides, con la parte central ensanchada, uniseptadas, de color marrón oscuro, pared moderadamente gruesa y con la superficie lisa o finamente verrugosa en el interior. Los conidios son de color marrón, ovoides, truncados en la base y con un septo (Figura II.5 L) (Phillips *et al.*, 2005).

La identificación de las especies de la familia Botryosphaeriaceae es compleja, debido en gran parte al elevado número de especies descritas. Dada su naturaleza cosmopolita, a lo largo de los años se ha utilizado una nomenclatura diferente para designar una misma especie (Ej. *Di. seriata* ha sido conocido como *Diplodia profusa*, *Diplodia pseudodiplodia*, *Botryosphaeria obtusa*, *Sphaeria obtusa*, *Melanops quercum*, *Physalospora obtusa*, *Physalospora cydoniae*, o *Physalospora malorum*) (“*The Botryosphaeria site*”, enlace: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site). Además, como ocurre con otros hongos asociados a los decaimientos de la vid (Ej. *Phaeoacremonium/Togninia*) la duplicidad en la nomenclatura para designar tanto la fase anamorfa como teleomorfa de una misma especie, no hace sino incrementar la complejidad.

En las especies de la familia Botryosphaeriaceae, la producción de esporas en medio de cultivo es muy lenta y a menudo dificulta la caracterización morfológica de las especies. Los estudios comparativos de secuencias génicas, siempre apoyados en la descripción de caracteres morfológicos, son una alternativa muy eficiente para abordar la identificación de Botryosphaeriaceae spp. Su análisis ha llevado a realizar numerosas revisiones que han introducido nuevos géneros y renombrado muchas especies. Con el fin de facilitar la tarea de identificación de las especies de Botryosphaeriaceae, el Dr. Phillips, de la Universidad Nova de Lisboa (Portugal), ha desarrollado una página web dónde se incluye un amplio listado de descriptores morfológicos y citas bibliográficas: “*The Botryosphaeria site*” (http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site).



Figura II.4. Eutipiosis. A: Planta adulta con uno de sus brazos afectados por eutipiosis con pámpanos débiles y hojas pequeñas y cloróticas (Cobos, 2008). B: Necrosis sectorial en forma de "V" observada en un corte transversal (Andolfi *et al.*, 2011). C: Ascosporas de *E. lata* (Trouillas & Gubler, 2004. Barra 10 μ m).

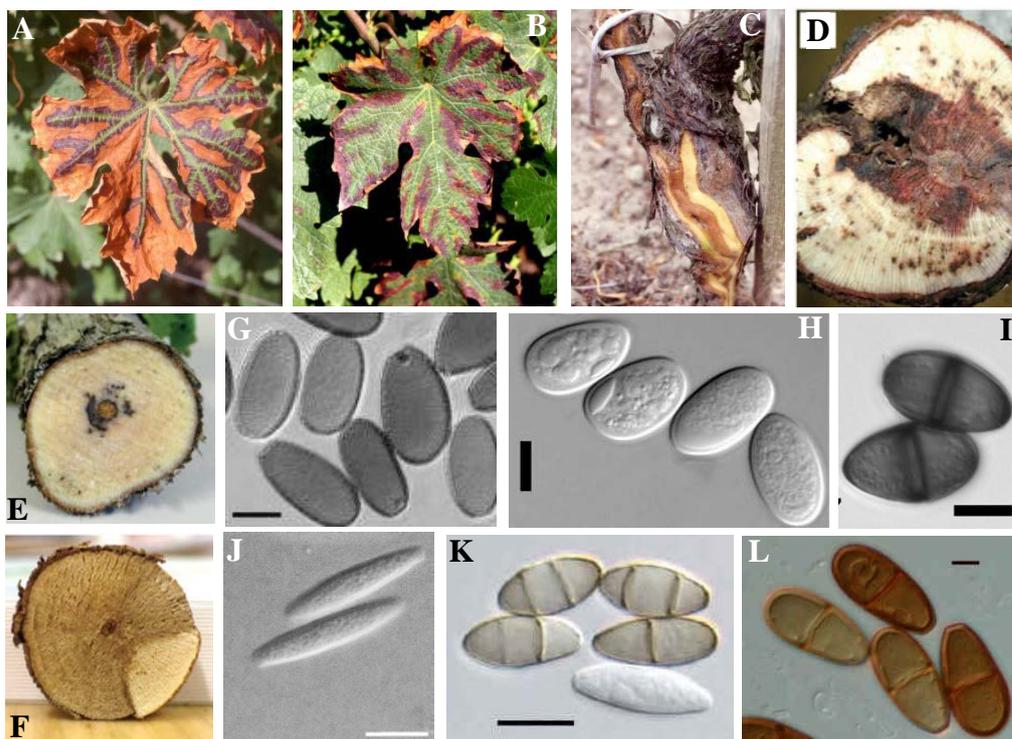


Figura II.5. Brazo muerto (BDA). A-C: Sintomatología de *Black Dead Arm* (Larignon *et al.*, 2001). D-F: Síntomas de vid asociados con la infección de Botryosphaeriaceae (van Niekerk *et al.*, 2006). G: Conidios de *Di. seriata* (Phillips, 2002). H: Conidios inmaduros de *L. theobromae* (Alves *et al.*, 2008). I: Conidios maduros de *L. theobromae* (Alves *et al.*, 2008). J: Conidios de *B. dothidea* (Slippers *et al.*, 2004). K: Conidios de *N. parvum* (The Botryosphaeria site.). L: Conidios de *Do. sarmentorum* (The Botryosphaeria site). Barras 10 μ m.

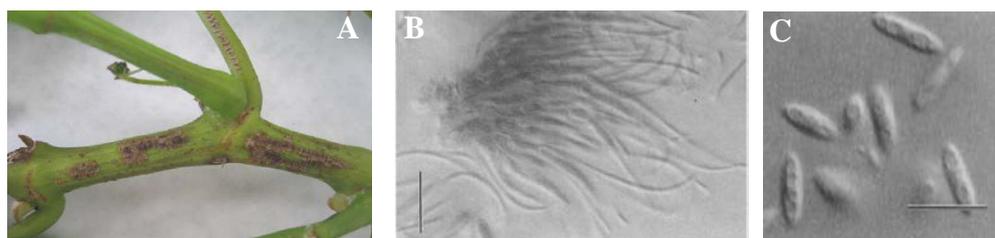


Figura II.6. Excoriosis. A: Necrosis en forma de tableta de chocolate en sarmiento verde (Cobos, 2008). B: Conidios tipo beta de *Phomopsis viticola* (Mostert *et al.*, 2001). C: Conidios tipo alfa y gamma de *Phomopsis viticola* (Mostert *et al.*, 2001). Barras 10 μ m.

vi. Excoriosis

La enfermedad denominada excoriosis no es propiamente una enfermedad de decaimiento de la vid. Sin embargo el hongo responsable de esta patología es aislado con cierta frecuencia en plantas afectadas por las enfermedades de decaimiento de la vid descritas anteriormente. El término excoriosis fue introducido por Ravaz & Verge (1925) para denominar una enfermedad de vid observada en varias regiones de Francia. Esta enfermedad ocurre en todas las regiones del mundo donde se cultiva la vid. La excoriosis es una de las enfermedades de la madera de la vid mejor conocidas. El agente causal es el hongo *Phomopsis viticola* y produce importantes daños, especialmente en regiones con primaveras lluviosas. Se propaga con cierta facilidad por todo el viñedo, porque el hongo resiste el invierno en forma de picnidios en la madera y yemas afectadas. La presencia de *Phomopsis viticola* en España ha sido publicada por varios autores (Aroca *et al.*, 2006; Martín & Cobos, 2007).

a. Sintomatología

La excoriosis puede afectar a todos los órganos verdes de la planta. En los brotes jóvenes o pámpanos se observan manchas alargadas y poco profundas de color negro o marrón que con el tiempo se agrietan, produciendo fisuras abiertas en el tejido cortical. Las infecciones son más numerosas en los entrenudos basales y evolucionan hacia lesiones de color marrón oscuro que toman el aspecto típico de “tableta de chocolate” (Figura II.6 A).

Durante el verano según se lignifican los brotes herbáceos, las áreas necrosadas que rodean a las grietas se cuartejan y aparece un blanqueamiento típico de los sarmientos, en el que se observan numerosos picnidios negros. En el invierno los picnidios se hacen prominentes y levantan la epidermis, dejando pasar el aire bajo ella, lo que proporciona a la superficie del sarmiento un brillo plateado o blanquecino. Los sarmientos afectados se tornan débiles y quebradizos, rompiéndose con frecuencia en las zonas de los estrangulamientos que produce la enfermedad. El micelio del hongo coloniza las yemas lo que provoca el aborto en la primavera siguiente (Dubos, 2002).

Las hojas afectadas por excoriosis tienen manchas pequeñas, irregulares o circulares, cloróticas con centros oscuros, que pueden necrosar y desprenderse dejando agujeros en el limbo. Estas manchas pueden desarrollarse junto a los nervios, en el peciolo o en el borde, doblándolo hacia arriba.

Los síntomas en racimos se localizan en el pedúnculo y el raquis, son similares a los descritos en las hojas, y ocasionan un mal cuajado o incluso el desecamiento del racimo.

b. Etiología y taxonomía

El ciclo biológico del agente causal de la excoriosis es bien conocido. *Phomopsis viticola* pasa el otoño-invierno en la madera de los sarmientos, en las yemas y en menor medida en troncos y brazos de la cepa. En primavera y coincidiendo con el desborre de la viña, el hongo entra en actividad tras la maduración de las esporas. Los picnidios liberan las esporas aglutinadas en una masa gelatinosa, diseminándose por la acción del agua de lluvia y produciendo la contaminación de los brotes jóvenes (Pérez Marín, 2004).

El género *Phomopsis* pertenece a la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Diaporthales, familia Valsaceae. También pertenece al grupo de Hongos Mitospóricos y su teleomorfo recibe el nombre de *Diaporthe*. Se trata de un género numeroso, que alberga más de 200 especies consideradas como saprófitas, endofíticas o patógenas de un amplio rango de cultivos (Udayanga *et al.*, 2011). Se han descrito hasta un total de 15 especies del género asociadas a los decaimientos de la vid (van Niekerk *et al.*, 2005). Aunque varias especies parecen estar restringidas a determinadas zonas vitivinícolas. Algunos ejemplos son: *P. amygdali* y *P. helianthi* en Sudáfrica; *D. austrolafricana* en Australia y Sudáfrica o *P. vitimegaspora* en Taiwan. Se ha demostrado que la especie más cosmopolita y patógena de vid es *Phomopsis viticola* (Kuo & Leu, 1998; Mostert *et al.*, 2001; Rawnsley *et al.*, 2004; van Niekerk *et al.*, 2005; Udayanga *et al.*, 2011).

c. Descripción morfológica de *Phomopsis viticola*

El micelio de este hongo en medio PDA forma una densa maraña, es hialino, septado y ramificado. Con el tiempo produce picnidios que aparecen en

las zonas más oscuras de la maraña de forma irregular. Los picnidios son de color negro, tienen un diámetro de 0,2 a 0,4 mm y pueden mostrarse de manera individual o en grupos. *Phomopsis viticola* se caracteriza por formar conidios de dos tipos: (i) conidios tipo alfa, contenidas en un picnidioforo con ápice puntiagudo de unos 25 x 2 μm , son hialinas en forma de uso o elipsoidales de 9,5-10,5 x 2-3 μm (Figura II.6 C). (ii) conidios tipo beta, producidas en picnidioforos de 26 x 1,5 μm , son alargadas, curvadas o filiformes que miden 20-25 x 0,5-1 μm (Figura II.6 B). También se ha descrito la existencia de conidios de tipo gamma, raramente encontradas (Mostert *et al.*, 2001).

Por último y solo como apunte, ya que en esta memoria no se trata en ningún momento, señalar el desarrollo de estudios recientes sobre fitotoxinas producidas entre otros hongos por *E. lata*, *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum*, *Di. seriata* y *N. parvum*. La expresión, acción y regulación de estas fitotoxinas todavía no es bien conocida, pero parece estar relacionada con el desarrollo de síntomas de decaimiento en vid (Andolfi *et al.*, 2011).

III. MEDIDAS DE CONTROL

A principios del siglo XX, se observó que el arsenito sódico, utilizado como insecticida, también tenía actividad fungicida y permitía controlar la yesca. Posteriormente, durante los años 70 su utilización contra la yesca fue generalizada. La eficacia del arsenito sódico reside en su alta toxicidad, y su capacidad para penetrar hasta el xilema, aniquilando la mayor parte de los hongos (Larignon *et al.*, 2008). Las sales de arsenito son cancerígenas, lo que ha provocado la prohibición gradual de su uso en todos los países y para todos los cultivos (Spinosi *et al.*, 2009).

Como consecuencia de la prohibición del arsenito sódico, se ha intensificado la incidencia de los decaimientos de la vid en todo el mundo. A pesar del esfuerzo realizado por investigar nuevos fungicidas, basados en productos químicos de síntesis y capaces de sustituir el arsenito sódico, los resultados han demostrado siempre una menor eficiencia, contribuyendo al incremento de estas enfermedades (Graniti *et al.*, 2000).

Numerosas materias activas han sido probadas frente a *Pa. chlamydospora* (Groenewald *et al.*, 2000; Jaspers *et al.*, 2001; Gramaje *et al.*, 2009c), *Cylindrocarpon spp.* (Rego *et al.*, 2006 y 2009; Halleen *et al.*, 2007; Alaniz *et al.*, 2011b) y *Phomopsis viticola* (Nita *et al.*, 2006; Rego *et al.*, 2009). Sin embargo, existe poca información sobre la eficacia de fungicidas frente a Botryosphaeriaceae (Rego *et al.*, 2009) y *Pm. aleophilum* (Gramaje *et al.*, 2009c).

La mayoría de estos ensayos han sido realizados *in vitro*, evaluando la capacidad de inhibir la germinación de las esporas y el crecimiento micelial en el laboratorio. Pero una de las mayores dificultades planteadas en el tratamiento de los decaimientos de la vid, es conseguir que la materia activa llegue al interior de los tejidos vasculares de la planta penetrando en la madera a las concentraciones adecuadas. Algunos de estos fungicidas inhiben el crecimiento fúngico únicamente en contacto directo y no a distancia (Martín *et al.*, 2010).

La tendencia más actual de los productos fitosanitarios basados en materias activas químicas es la desaparición. Cada vez son más las sustancias prohibidas y el tiempo que los fungicidas permanecen en el mercado se reduce a unos pocos años. Esto se debe a los problemas de contaminación registrados en la atmósfera, los suelos y los acuíferos, así como el perjuicio que ocasionan sobre la vida humana y de otras especies.

Otro factor importante que promueve la prohibición de los productos fitosanitarios es la aparición de resistencias que ocurre cada vez con mayor frecuencia (Ma *et al.*, 2005), reduciendo significativamente la efectividad de su uso.

En un trabajo reciente Martín *et al.*, (2010), encontraron que se requieren concentraciones superiores a las recomendadas por el fabricante para inhibir completamente el crecimiento micelial de 10 especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Sin embargo, es muy importante no incrementar las concentraciones utilizadas en el campo debido a la posible toxicidad de las materias activas.

Durante los últimos años, se ha incrementado el número de hectáreas de vid dedicadas a la producción ecológica, la cuál restringe la utilización de productos químicos. Como respuesta a este sector y alternativa a la desaparición de los fungicidas químicos se están desarrollando estrategias de control biológico.

Uno de los métodos de biocontrol más estudiados actualmente es la aplicación de *Trichoderma harzianum* o productos derivados del cultivo de éste hongo. Se ha demostrado la actividad fungiestática de los compuestos volátiles producidos por *T. harzianum* frente a *E. lata*, así como su capacidad para inhibir el crecimiento micelial y reducir la infección de sarmientos autoclavados. Pero, tanto el patógeno (*E. lata*) como el antagonista (*T. harzianum*) fueron capaces de crecer en los vasos del xilema y las células del parénquima (Sharmini *et al.*, 2004). Otros trabajos han demostrado la viabilidad de los formulados de *Trichoderma* aplicados en forma de spray (Di Marco *et al.*, 2004) y su capacidad para penetrar en la planta de vid a través de las heridas de poda (Hunt *et al.*, 2001), pero su eficacia contra los hongos asociados a los decaimientos de la vid ha sido inconstante.

Algunas plantas sintetizan y acumulan compuestos antimicrobianos (fitoalexinas, como el resveratrol) después de infecciones bacterianas o fúngicas que ayudan a limitar la dispersión del patógeno. Santos *et al.* (2006) analizaron plántulas de vid *in vitro* inoculadas con hongos asociados a los decaimientos de la vid, y sugirieron que la presencia de resveratrol puede ser útil para inducir la resistencia frente a *Pa. chlamydospora* y *Pm. angustius*.

El quitosano, un polímero de alto peso molecular, biodegradable, no tóxico e inductor de mecanismos de defensa en vegetales ha sido evaluado como una alternativa a los fungicidas convencionales. Nascimento *et al.* (2007) demostraron que, en placa de cultivo, el quitosano reduce el crecimiento micelial de *Pa. chlamydospora*, *Fomitiporia* sp., *Botryosphaeria* sp., y *C. liriodendri*.

Otra opción valorada ha sido la inoculación con hongos micorrizicos arbusculares, como *Glomus intraradicens*, porque mejora la incorporación de nutrientes en la planta de vid, puede compensar los efectos de las enfermedades

vasculares y prevenir la aparición de pie negro tanto en viveros como en plantaciones ya establecidas (Petit & Gubler, 2006).

Las investigaciones en el campo del control biológico, no han demostrado todavía ser altamente eficientes, aunque proyectan buenas expectativas y constituyen nuevas líneas de investigación.

Dado que el número y la eficacia de las nuevas materias activas es cada vez menor, y las pocas alternativas que ofrece un control biológico, las medidas profilácticas y las buenas prácticas culturales se han perfilado como la mejor estrategia para evitar los decaimientos de la vid.

Debido al incremento de la presencia de los hongos responsables de los decaimientos de la vid en el material vegetal de propagación, las investigaciones más recientes se han centrado en el saneamiento de las plantas durante la fase de multiplicación en vivero, utilizando medidas de control físico, químico o biológico.

i. En viñedos establecidos

La erradicación de los hongos fitopatógenos, una vez que ya han infectado la planta es difícil. No obstante existen una serie de pautas que deben seguirse en el manejo de las parcelas afectadas. Es importante realizar un seguimiento individual, observando los posibles síntomas externos de las cepas afectadas y etiquetarlas para comprobar la evolución de la enfermedad. La poda curativa, que consiste en la eliminación completa de la zona afectada, es la medida más efectiva (Sosnowski *et al.*, 2010). Después de realizar este saneamiento es aconsejable aplicar un aislante con o sin fungicida para evitar una nueva infección (Mugnai *et al.*, 1999; Herche & Gubler, 2010). Eliminar los restos de la poda curativa constituye otra práctica cultural imprescindible (Sosnowski *et al.*, 2010), tiene que realizarse inmediatamente para disminuir las fuentes de inóculo en la parcela (Mugnai *et al.*, 1999).

Igualmente, las cepas completamente afectadas, sin posibilidad de realizar una poda curativa deben ser arrancadas desde la raíz y eliminadas cuanto antes. Antes de reponer las marras hay que excavar profundamente para airear el suelo y aplicar algún producto químico para desinfectarlo. La

replantación puede realizarse por acodo, siempre que la vid adyacente esté sana y se aconseja llevar a cabo un cuidado óptimo e individual de la nueva cepa hasta su desarrollo y equiparación con las demás plantas.

Las heridas de poda pueden constituir una vía de entrada de los hongos responsables de los decaimientos de la vid (Graniti *et al.*, 2000; Eskalen *et al.*, 2007). Algunos hábitos de poda pueden reducir la susceptibilidad de las heridas. Así, se aconseja reducir la sección del corte, proteger las heridas con fungicidas (Mugnai *et al.*, 1999; Herche & Gubler, 2010), evitar las operaciones de poda en días lluviosos, no incurrir en una renovación excesiva de pulgares y desinfectar los utensilios de poda entre cepa y cepa para evitar contagios. Algunas de las mejores estrategias de poda en el manejo de los viñedos para reducir la propagación de los decaimientos de la vid consisten en realizar una prepoda larga y una poda definitiva tardía (Chapuis *et al.*, 1998; Herche & Gubler, 2010). La poda en verde también reduce heridas mayores durante la poda en seco.

ii. En plantaciones nuevas

El material vegetal de vivero (plantas madres, barbados o plantas-injerto) puede albergar hongos asociados a los decaimientos de la vid (Fourie & Halleen, 2004a; Dubrovsky & Fabritius, 2007; Aroca *et al.*, 2010). En España, el material certificado, de acuerdo con el Real Decreto 208/2003 por el que se aprueba el Reglamento Técnico de Control y Certificación de plantas de vivero de vid (modificado por la Orden APA/2474/2006), constituye una garantía de calidad. Según esta normativa el material certificado está completamente libre de virus y establece entre otros organismos nocivos los hongos *Phomopsis* sp., *Eutypa armeniaca* y *Stereum* sp., pero permite ligeras infestaciones siempre que se hayan realizado los tratamientos oportunos. Por lo tanto, aunque el material certificado está libre de virus, no significa que esté libre de las enfermedades de decaimiento de la vid.

Como método preventivo deberían realizarse análisis para determinar la presencia de hongos tanto en los campos de pies madres, como en los distintos pasos del proceso de propagación que se desarrollan en los viveros comerciales. Para poder realizar este trabajo es necesario i) conocer los hongos

implicados y ii) disponer de métodos de identificación y detección que sean rápidos, sensibles, poco complejos y económicamente viables.

a. Prácticas culturales

Las prácticas culturales más efectivas son, además de la utilización de material vegetal sano, realizar un baño con fungicida antes de la plantación (tras recortar las raíces) y reducir las condiciones de estrés hídrico durante los primeros años de la plantación (Halleen *et al.*, 2006b). La preparación del terreno, incluyendo la retirada completa del material vegetal anterior, una correcta aireación, un buen drenaje o una desinfección previa del suelo antes de establecer la nueva plantación también ayudan en la prevención de los decaimientos de la vid.

b. Mejora sanitaria desde los viveros

-Termoterapia

La termoterapia es una alternativa de tipo físico que consiste en la inmersión en agua caliente (50-53 °C unos 30 min) del material vegetal de propagación antes de su comercialización. Los resultados obtenidos son esperanzadores para el control de *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., y *Cylindrocarpon* spp. (Laukart *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.* 2010b). Sin embargo, estos tratamientos pueden provocar, en ocasiones, problemas de brotación en el material de plantación (Waite & May, 2005; Waite & Morton, 2007) y no protegen de una posterior infección durante el proceso de enraizamiento o en la plantación definitiva.

-Control químico

Varios estudios han evaluado la efectividad de determinados fungicidas aplicados en distintos momentos del proceso de propagación en viveros. Fourie & Halleen (2006) compararon tratamientos biológicos con tratamientos químicos en un vivero semi-comercial. Los tratamientos fueron aplicados en tres pasos diferentes de la producción de nuevas plantas. Sus resultados mostraron una mayor reducción de la incidencia de los hongos asociados a los decaimientos de la vid con benomilo, didecildimetil cloruro amónico o captan;

pero algunos de estos compuestos influyeron negativamente en el desarrollo posterior de la planta. Rego *et al.*, (2009) encontraron que la inmersión de los portainjertos y las varas en una suspensión de ciprodinil y fludioxonil reducía la incidencia y severidad de *Cylindrocarpon* spp. y Botryosphaeriaceae.

En un trabajo similar, Gramaje *et al.*, (2009c) encontraron que la utilización de didecildimetil cloruro amónico durante el proceso de hidratación de las varas fue el tratamiento más eficiente como desinfectante para prevenir la infección con *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Al mismo tiempo, estos autores investigaron tres estrategias de control diferentes empleando carbendazima, carbendazima + flusilazol (Escudo®) y sulfato de hidroxiquilonina en distintos pasos del proceso. La efectividad de las tres estrategias fue comparada en dos viveros comerciales independientes. La utilización de carbendazima durante el paso de hidratación fue el tratamiento más efectivo. Con todo, ninguna de las dos materias activas más eficientes (carbendazima y didecildimetil cloruro amónico) está registrada en la actualidad en España para combatir las enfermedades de decaimiento de la vid (De Liñan, 2008; Gramaje *et al.*, 2009c).

-Control biológico

Varias investigaciones han demostrado el potencial de los formulados de *Trichoderma*, porque reducen la incidencia de *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* y *Cylindrocarpon*, y aumentan la masa radicular de las nuevas plantas de vid (Fourie *et al.*, 2001). Di Marco *et al.*, (2004) determinaron que la utilización de formulados de *Trichoderma* sp. (*T. harzianum* -T39 Trichodex®- y *T. longibrachiatum* -cepa6-) después de la formación del callo reducía los síntomas causados por la inoculación de *Pa. chlamydospora* y aumentaba el crecimiento radicular. Pero la inmersión de las varas en estos mismos formulados, antes del injertado, produjo resultados contradictorios (Di Marco *et al.*, 2004).

Según Fourie & Halleen (2004b), algunos formulados de *Trichoderma* pueden sustituir con igual efectividad a los tratamientos con benomilo y, combinado con la termoterapia, reducen significativamente la presencia de *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* en la producción de plantas.

Sin embargo, estudios más recientes han precisado que *Trichoderma* solo es notablemente eficiente en tratamientos para mejorar el enraizamiento de vid, la tolerancia a enfermedades relacionadas con el estrés y la protección contra hongos de suelo (Di Marco & Osti, 2007). En la misma línea actuarían otros métodos de control biológico como el quitosano, que mejora el crecimiento de la planta (Nascimento *et al.*, 2007), o la inoculación con micorrizas (Petit & Gubler, 2006). En 2007, Halleen *et al.*, concluyeron que la mayoría de los tratamientos químicos, como el uso de *Trichoderma*, no reducen significativamente la presencia de los hongos asociados a pie negro o a la enfermedad de Petri y confirmaron que la termoterapia es el tratamiento más efectivo para reducir la incidencia de los hongos responsables de estas enfermedades en los viveros.

c. Control integrado

A la luz de los resultados obtenidos en todas las investigaciones, se puede concluir que tras la prohibición del arsenito sódico, no existen en el mercado productos químicos o biológicos capaces de controlar los decaimientos de la vid. Las investigaciones más innovadoras están enfocadas al saneamiento de las plantas en la etapa de vivero mediante estrategias de control integrado, que combinen tanto medidas de control químico como alternativas de tipo físico o biológico (Fourie & Halleen, 2004b; Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2009c).

IV. OBJETIVOS

- Evaluar la presencia de las enfermedades que integran los decaimientos de la vid en Castilla y León mediante prospecciones en campo.
- Identificar y estudiar la distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid.
- Analizar y comparar la variabilidad genética de *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*.
- Desarrollar nuevos sistemas de detección para las especies mayoritarias (*Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*).
- Caracterizar fenotípica y molecularmente distintas especies de *Phaeoacremonium* y analizar la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*.
- Relacionar la patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum* con su variabilidad genética.
- Comparar la susceptibilidad de las variedades de vid Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura a la infección por *Pm. aleophilum*.
- Determinar la existencia de aislados de *Pm. aleophilum* resistentes a fungicidas y buscar las alteraciones genéticas responsables de su resistencia.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 91: 1187-1193.
- Alaniz, S. (2008). Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Alaniz, S., Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., Aguilar, M.I., Pérez-Sierra, A. & Armengol, J. (2011a). First Report of *Campylocarpon fasciculare* Causing Black Foot Disease of Grapevine in Spain. *Plant Disease*, 95: 1028.
- Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2011b). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* in vitro, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 30: 489-494.
- Alves, A., Correia, A., Luque, J. & Phillips, A.J.L. (2004). *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96: 598-613.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. & Phillips, A.J.L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28: 1-13.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A. & Evidente, A. (2011). Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *Toxins*, 3: 1569-1605.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. & García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): 325-329.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.
- Aroca, A., Garcia-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2007). First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevines in Spain. *Plant Pathology*: 57, 386.

- Aroca, A. & Raposo, R. (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* Species on Grapevines. *Journal of Phytopathology*, 157: 413-419.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 165-174.
- Auger, J., Esterio, M., Ricke, G. & Perez, I. (2004). Black dead arm and basal canker on *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88, 1286.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2012a). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, 116: 62-80.
- Cabral, A., Groenewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. & Crous, P.W. (2012b). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress*, 11: 655-688.
- Carter, M.V. (1976). Biennial Report of the Waite Agricultural research Institute, South Australia, for 1974-1975, pp. 96-7.
- Carter, M.V. (1991). The status of *Eutypa lata* as pathogen. *Phytopathological Papers*, 32: 1-59.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O. & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 73-83.
- Chapuis, L., Richard, L. & Dubos, B. (1998). Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology*, 47: 463-472.
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A.Y. & Samuels, G.J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68: 58-78.
- Chomé, P.M. (2002). Catálogo de variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Chomé, P.M. (Coord.). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica (Ed.). Madrid (España). pp. 303.
- Cobos, R. (2008). Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

- Cristinzio, G. (1978). Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia di Isernia. *Informatore Fitopatologico*, 6: 21-23.
- Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J. & Van Wyk, P.S. (1996). *Phaeocremonium* gen.nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88: 786-796.
- Crous, P.W. & Gams, W. (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a casual organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 112-118.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burguess, T., Barber P. & Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55: 235-253.
- Damm, U., Mostert, L., Crous, P.W. & Fourie, P.H. (2008). Novel *Phaeocremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia*, 20: 87-102.
- De Liñan, C. (2008). Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. En: Ediciones Agrotécnicas, S.L., p 784.
- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I. & Wingfield, M.J. (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45: 129-140.
- Denman, S., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Slippers, B., Wingfield, B.D. & Wingfield, M.J. (2003). Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia*, 95: 294-307.
- Di Marco, S., Mazullo, A., Calzarano, F., & Cesari, A. (2000). The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 232-240.
- Di Marco, S., Osti, F. & Cesari, A. (2004). Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 108-115.
- Di Marco, S. & Osti, F. (2007). Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 73-83.
- Dubos, B. (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. Ed. Feret. Bordeaux.
- Dubrovsky, S. & Fabritius, A.L. (2007). Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 84-86.

- Dupont, J., Laloui, W. & Magnin, S. (2000). *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. *Mycologia*, 92: 499-504.
- Edwards, J., Marchi, G., & Pascoe, I.G. (2001). Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S303-S310.
- Edwards, J. & Pascoe, S. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australia grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 33: 273-279.
- Edwards, J., Pascoe, I.G., Salib, S. & Laukart, N. (2004). Hot treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 158-159.
- Eskalen, A., Feliciano, A.J. & Gubler, W.D. (2007). Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*, 91: 1100-1104.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P. W., Gronewald, J. Z. & Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*, 21: 119-134.
- FAO. 2012. Datos agrícolas de FAOSTAT. Enlace: <http://www.fao.org>
- Feliciano, A.J., Eskalen, A. & Guber, W.D. (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 66-69.
- Ferreira, J.H.S., Van Wyk, P.S. & Calitz, F.J. (1999). Slow dieback of grapevine in South Africa: stress-related predisposition of young vines for infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20: 43-46.
- Fischer, M. (1996). On the species complexes within *Phellinus*: *Fomitiporia* revisited. *Mycological Research*, 100: 1459-1467.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1: 315-324.
- Fischer, M. & Kassemeyer, H.H. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, 42: 109-116.
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S30-S42.
- Fourie, P.H., Halleen, F., van der Vyver, J. & Schreuder, W. (2001). Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the

- roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S473-S478.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2004a). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33: 313-315.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2004b). Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. *Plant Disease*, 88: 1241-1245.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 255-265.
- Gatica, M., Césari, C., Magnin, S. & Dupont, J. (2001). *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing “hoja de malvón” and young vine decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S317-S324.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2006). Occurrence of Fungal Pathogens Associated with Grapevine Nurseries and Decline of Young Vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154: 598-602.
- González, V. & Tello, M.L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47: 29-42.
- Graham, A.B., Johnston, P.R. & Weir, B.S. (2009). Three new *Phaeoacremonium* species on grapevines in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 38: 505-513.
- Gramaje, D., Alainz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). First report of *Phaeoacremonium mortoniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*: 91, 1206.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2008). First report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 92: 836.
- Gramaje, D., Armengol, J., Colino, M.J., Santiago, R. Moralejo, E., Luque, J. & Mostert, L. (2009a). First report of *Phaeoacremonium inflatipes*, *P. iranianum*, and *P. sicilianum* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 93: 964
- Gramaje, D., Armengol, J., Mohammadi, H., Banihashemi, Z. & Mostert, L. (2009b). Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia*, 101: 920-929.

- Gramaje, D., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2009c). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine process. *Crop Protection*, 28: 1091-1097.
- Gramaje, D., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2010a). Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 512-520.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Giménez, J. & Armengol, J. (2010b). Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology*, 156: 231-241.
- Graniti, A., Surico, G. & Mugnai, L. (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 16-20.
- Grasso, S. & Magnano Di San Lio, G. (1975). Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporium* su piante di vite in Sicilia. *Vitis*, 14: 36-39.
- Groenewald, M., Denman, S. & Crous, P.W. (2000). Fungicide sensitivity of *Phaeomoniella chlamydospora*, the causal organism of Petri grapevine decline. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 59-61.
- Groenewald, M., Kang, J.C., Crous, P.W. & Gams, W., (2001). ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycological Research*, 105: 651-657.
- Guarro, J., Alves, S.H., Gené, J. Grazziotin, N.A., Mazzuco, R., Dalmagro, C. Capilla, J., Zaror, L. & Mayayo, E. (2003). Two cases of subcutaneous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1332-1336.
- Halleen, F., Schroers, H.J., Gronewald, J.Z. & Crous, P.W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot diseases of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, 50: 431-455.
- Halleen, F., Schroers, H.J., Gronewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. & Crous, P.W. (2006a). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology*, 55: 227-234.
- Halleen, F., Fourie, P.H. & Crous, P.W. (2006b). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S55-S67.
- Halleen, F., Fourie, P.H., & Crous, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56: 637-645.

- Herche, R. & Gubler, W.D. (2010). Control strategies for trunk diseases of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 125.
- Hidalgo, L. (2002). Tratado de Viticultura General. 3ª edición. Editorial Mundi-Prensa S.A.
- Hunt, J.S., Gale, D.S.J. & Harvey, I.C. (2001). Evaluation of *Trichoderma* as bio-control for protection against wood-invading fungi implicated in grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S485-S486.
- Jacobs, K.A. & Rehner, S.A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia*, 90: 601-610.
- Jaspers, M.V. (2001). Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S453-S458.
- Kuo, K.C. & Leu, L.S. (1998). *Phomopsis vitimegaspora*: a new pathogenic *Phomopsis* from vines. *Mycotaxon* 66: 497-499.
- Lardner, R., Stummer, B.E., Sosnowski, M.R. & Scott, E.S. (2005). Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*, 109: 799-808.
- Larignon, P. & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 147-157.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. & Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in french vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (Supplement): S336-S342.
- Larignon, P. (2004). Réflexions sur l'esca. *Phytoma- La Défense des Végétaux*, 576: 28-31.
- Larignon, P., Darné, G., Ménard, E., Desaché, F. & Dubos, B (2008) Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne ? *Progrès Agricole et Viticole*, 125: 642-651.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C. & Bertsch, C. (2009). Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies*, 332: 765-783.
- Laukart, N., Edwards, J., Pascoe, I.G. & Nguyen, N.K. (2001). Curative treatments trialed on young grapevines infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S459-S463.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated

- diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 32-46.
- Lecomte, P., Leyo, M., Louvet, G., Corio-Costet, M.F., Guadillère, J.P. & Blancard, D. (2005). Le Black Dead Arm, genèse des symptômes. *Phytoma – La défense des végétaux*, 587: 29-37.
- Lehoczky, J. (1974). Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9: 319-327.
- Lehoczky, J. (1996). Black Dead Arm. En: Plagas y enfermedades de la vid, p. 35. Pearson, R.C. & Goheen, A.C. (Eds). American Phytopathological Society. APS Pres - Mundi Prensa. Madrid.
- Luque, J., Martos, S. & Phillips, A.J.L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, 97: 1111-1121.
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R. & Garcia-Fihueres, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology*, 91: 381-390.
- Ma, Z. & Michailides, T. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24: 853-863.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2012a). Avance Anuario de Estadística. 2011. Madrid (España). pp. 721-746. Enlace: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estad-publicaciones/anuario-de-estadistica/>
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2012b). Datos de las denominaciones de origen protegidas de vinos (DOPs). Madrid (España). pp. 6-39. Enlace: http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/Libros_2012_Letra_D.aspx
- Maluta, D.R. & Larignon, P. (1991). Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture*, 11: 71-72.
- Martin, M.T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.
- Martín, M.T., Fuertes, C., García, P., de Francisco, M.T., Zumel, A. & Martín, L. (2010). Efecto in vitro de tres fungicidas sobre diez especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid. *Tierras-Agricultura*, 166: 134-139.

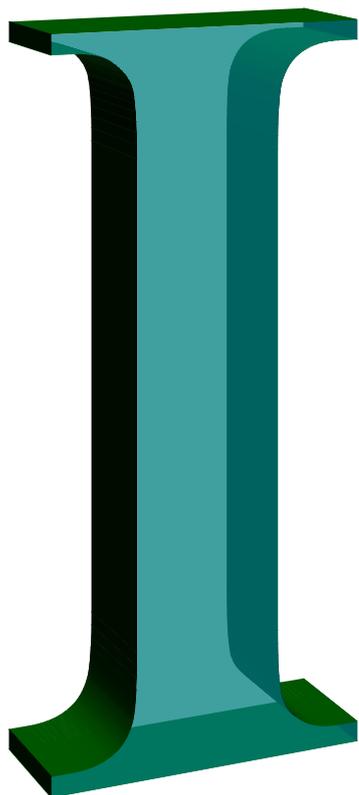
- Martín, M.T., Martín, L., Cuesta M.J. & García-Benavides, P. (2011). First Report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* Associated with Grapevine Decline from Castilla y León, Spain. *Plant Disease* 95: 361.
- Morton, L. (2000). Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 59-67.
- Mostert, L., Crous, P.W., Kang, J.C. & Phillips, A.J. (2001). Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*, 93: 146-167.
- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. & Summerbell, R.C. (2003). *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Robert, V., Sutton, D.A., Padhye, A.A., & Crous P.W. (2005). Species of *Phaeoacremonium* associated with human infections and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1752-1767.
- Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P. & Crous P.W. (2006a). A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S12-S29.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W. & Crous P.W. (2006b). Taxonomy and Pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54: 1-115.
- Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83: 404-418.
- Muruamendiaraz, A., Iturrutxa, E. & Legorburu, F.J. (2007). Foliar symptoms of eutypa dieback are consistent over years and vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 122-123.
- Nascimento, T., Rego, C. & Oliveira, H. (2007). Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 218-224.
- Nita, M., Ellis, M.A., Wilson, L.L. & Madden, L.V. (2006). Evaluation of a Disease Warning System for Phomopsis Cane and Leaf Spot of Grape: A Field Study. *Plant Disease*, 90: 1239-1246.
- O.I.V. (International Organisation of Vine and Wine) (2008). 2ª Edición de la Lista de descriptores OIV para variedades de vid y especies de *Vitis*. Enlace: <http://www.OIV.int>

- O.I.V. (International Organisation of Vine and Wine) (2012). Statistical report on world vitiviniculture. Enlace: <http://www.OIV.int>
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Gryzenhout, M. & Wingfield, M.J. (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology*, 50: 313-322.
- Péros, J.P. & Berger, G. (2003). Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 909-919.
- Pérez Marín, J.L. (2004). Excoriosis (*Phomopsis viticola* Sacc.). En: Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, pp. 217-220. M.A.P.A. Mundi Prensa. Madrid.
- Petit, E. & Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89: 1051–1059.
- Petit, E. & Gubler, W.D. (2006). Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease* 90: 1481-1484.
- Petri, L. (1912). Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. *Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane*, 45: 501-547.
- Phillips, A.J.L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146: 327-332.
- Phillips, A.J.L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 3-18.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Correia, A. & Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97: 513-529.
- Phillips, A.J.L., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A. & Crous, P.W. (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomy status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia*, 21: 29-55.
- Rawnsley, B., Wicks, T.J, Scott, E.S. & Stummer, B.E. (2004). *Diaporthe perijuncta* does not cause Phomopsis cane and leaf spot disease of grapevine in Australia. *Plant Disease*, 88:1005-1010.
- Ravaz, L. & Verge, G. (1925). Sur une maladie de la vigne, l'Excoriose. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, France*, 180, 313–315.

- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., & Phillips, A. (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 76-79.
- Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A. & Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine: sensivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopatologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S93-S100.
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Silva, M.J. & Oliveira, H. (2009). Control of grapevine wood fungi in comercial nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 128-135.
- Reisenzein, H., Berger, N. & Nieder, G. (2000). Esca in Austria. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 26-34.
- Ridgway, H. J., Sleight, B. E. & Stewart, A. (2002). Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31: 267-271.
- Rubio, J.A., Yuste, J., Yuste, J.R., Alburquerque, M.V., Arranz, C. & Barajas, E. (2009). Clones certificados de las principales variedades tradicionales de vid en Castilla y León. Ed. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.
- Rumbos, I. & Rumbou, A. (2001). Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S330-S335.
- Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V. & Tuset, J.J. (2008). Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 650-660.
- Santos, C., Fragoeiro, S., Oliveira, H. & Phillips, A. (2006). Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. *Scientia Horticulturae*, 107: 131-136.
- Scheck, H.J., Vasquez, S.J. & Gubler, W.D. (1998). First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease*, 82: 590.
- Schroers HJ, Žerjab M, Munda A, & Halleen F. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research*, 112: 82-92.
- Sharmini, J., Scott, E.S., Wicks, T.J. & Hunt, J.S. (2004). Interactions between *Eutypa lata* and *Thrichoderma harzianum*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 95-104.

- Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Couthino, T.A., Wingfield, B.D. & Wingfield, M.J. (2004). Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96:83-101.
- Sosnowski, M.R., Wicks, T.W. & Scott, E.S. (2010). Controlling eutypa dieback by remedial surgery. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 125.
- Sparapano, L., Bruno, G. & Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopatologia mediterranea*, 40 (Supplement): S376-S386.
- Spinosi, J., Févotte, J. & Vial, G. (2009). Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. Santé travail. Institut de Veille Sanitaire, pp 1-20.
- Surico, G., Mugnai, L. & Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S68-S86.
- Taylor, A., Hardy, G.E.St.J., Wood, P. & Burguess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34: 187-195.
- Trouillas, F.P., Rolshausen, P.E. & Gubler, W.D. (2001). Importance of *Eutypa lata* and occurrence of other Diatrypaceous fungi in Northern California vineyards. *Phytopathology*, 91 (Supplement): S89.
- Trouillas, F.P. & Gubler, W.D. (2004). Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen of grapevine in Northern California. *Mycological Research*, 108: 1195-1204.
- Udayanga, D., Xingzhong, L., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H.A. & Hyde, K.D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50: 189-225.
- Úrbez-Torres, J.R., Peláez, H., Santiago, Y., Martín, C., Moreno, C. & Gubler, W.D. (2006). Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea* and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Disease*, 90: 835.
- Úrbez-Torres, J.R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement): S5-S45.
- van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Gronewald, J.C., Fourie, P.H. & Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.

- van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P.H., Halleen, F. & Crous, P.W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34: 27-39.
- van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F. & Crous, P.W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S43-S54.
- Waite, H. & May, P. (2005). The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 144-152.
- Waite, H. & Morton, L. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 5-17.
- White, C.L., Halleen, F. & Mostert, L. (2011). Symptoms and fungi associated with esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement): S236-S246.
- Wicks, T. & Hall, B. (1997). Eutypa dieback a serious disease. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 405: 61-62.
- Whitelaw-Weckert, M.A., Nair, N.G., Lamont, R., Alonso, M., Priest, M.J. & Huang, R. (2007). Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 36: 403-406.
- Zanzotto, A., Autiero, F., Belloto, D., Dal Cortivo, G., Lucchetta, G. & Borgo, M. (2007). Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 183-192.



Identificación y distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León

1.1. ANTECEDENTES

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

- 1.2.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León
- 1.2.2. Muestras de *Vitis vinifera*
- 1.2.3. Procesamiento y análisis de las muestras
- 1.2.4. Identificación morfológica
- 1.2.5. Identificación molecular

1.3. RESULTADOS

- 1.3.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León
- 1.3.2. Identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León
- 1.3.3. Distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León

1.4. DISCUSIÓN

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1.-IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN CASTILLA Y LEÓN

1.1. ANTECEDENTES

Los decaimientos de la vid comprenden un conjunto de enfermedades producidas por un amplio rango de especies de hongos fitopatógenos. En general, éstos hongos se desarrollan preferentemente en las células del xilema o cerca de ellas, obstruyendo los vasos e impidiendo una correcta circulación de la savia (Pascoe & Cottral, 2000). Su presencia provoca una drástica pérdida de vigor en la planta de vid, causando necrosis y/o podredumbre de la madera. Finalmente ocasionan la muerte de la planta, a menudo de forma prematura.

En planta adulta las principales enfermedades de los decaimientos de la vid son la yesca, la eutipiosis y el brazo muerto o black dead arm (BDA). En planta joven los decaimientos de la vid se asocian con la enfermedad de Petri y el pie negro. En la actualidad, son varios los grupos de investigación que buscan una relación entre los hongos aislados de plantas afectadas por los decaimientos de la vid y los síntomas observados. Una de las propuestas más aceptadas fue presentada en el año 2002 por Dubos *et al.* en su libro “Maladies cryptogamiques de la vigne”, resumida en la Figura 1.1.1.

Estos y otros autores señalan que puede haber una evolución o secuencia en el ataque de diferentes hongos. Unas especies precursoras u hongos pioneros que actúan ya desde los primeros estados de desarrollo de la planta, y favorecen el posterior ataque de otras especies, de colonización secundaria (Larignon & Dubos 1997; Surico *et al.*, 2006).

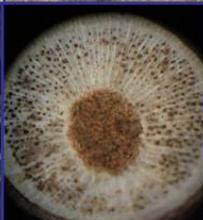
Enfermedades de los Decaimientos de la vid				
<p>Yesca Aparición síntomas: Agosto Hongos asociados: <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium spp.</i> <i>Fomitiporia mediterranea</i> <i>Stereum hirsutum</i></p>	<p>Eutiposis Aparición síntomas: Mayo/junio Hongos asociados: <i>Eutypa lata</i>, <i>Botryosphaeriaceae</i></p>	<p>Enfermedad de Petri Aparición síntomas: Julio/agosto Hongos asociados: <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium spp.</i></p>	<p>Pie Negro Aparición síntomas: Julio/agosto Hongos asociados: <i>Cylindrocarpon spp.</i></p>	<p>Brazo muerto Aparición síntomas: Julio/agosto Hongos asociados: <i>Botryosphaeriaceae</i></p>
				
				

Figura 1.1.1. Enfermedades de los decaimientos de la vid. Nombre de la enfermedad, época de aparición de los síntomas, hongos asociados, síntomas visibles en la parte externa de la planta y síntomas observados en la madera.

A pesar de los trabajos realizados todavía no existe un consenso que permita relacionar de forma concluyente la sintomatología observada con los hongos patógenos asociados a cada una de ellas. Varias son las dificultades que impiden a los investigadores conseguir este objetivo científico:

- Por una parte los síntomas externos presentan una gran versatilidad. Se ha demostrado que las plantas afectadas pueden desarrollar síntomas externos durante un ciclo vegetativo y no mostrarlos al año siguiente (Di Marco *et al.*, 2000). La sintomatología típica de cada enfermedad aparece en un determinado estado fenológico que tiene lugar en una fecha concreta y diferente en cada ciclo vegetativo. Para realizar una correcta anotación de la evaluación de los decaimientos de la vid es necesario el estudio de las mismas plantas a lo largo de varios años y la colaboración de los viticultores para conocer los tratamientos aplicados (sistemas de poda, laboreo, aplicación de fitosanitarios, etc). Estas circunstancias obligan a trabajar con rigurosidad en las prospecciones de campo y la recogida de muestras.

- La aparición de los síntomas propios de cada enfermedad se relaciona también con factores como las condiciones climáticas, principalmente humedad y temperatura (Surico *et al.*, 2004). A esta dificultad hay que añadir el hecho de que una planta enferma puede presentar deficiencias nutritivas y a menudo es atacada por otros agentes infecciosos como otros hongos, virus o larvas de insectos, cuyos síntomas se suman a los expresados por la presencia de los hongos de la madera.

- Para aislar los hongos asociados a los decaimientos de la vid se utiliza un método destructivo que obliga al arranque de la planta completa o al corte de partes importantes de ella para su análisis en el laboratorio. El estudio de plantas aparentemente sanas o sin síntomas es necesario desde el punto de vista científico pero supone un coste adicional para el sector.

- La sintomatología de los decaimientos de la vid es múltiple, compleja y a veces confusa ya que un mismo síntoma o una misma especie fúngica ha sido asociada a varias patologías. Ejemplos de esta complejidad son la similitud en las necrosis foliares internerviales en yesca y BDA, o la asociación de especies de la familia Botryosphaeriaceae con las sintomatologías de eutipiosis y BDA (Figura 1.1.1). La correlación entre los síntomas foliares observados en el campo y los daños presentes en la madera no siempre se ajusta a lo propuesto en la Figura 1.1.1. A menudo se observan varios síntomas simultáneamente en la madera que no se adaptan completamente a las formas típicas descritas para cada sintomatología. Las formas intermedias o combinadas son frecuentes en la madera, y algunas enfermedades pueden compartir síntomas de necrosis en los cortes transversales o longitudinales (ej. la necrosis sectorial en forma de V en madera afectada por eutipiosis y BDA).

- El proceso de aislamiento e identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid es un trabajo largo y tedioso que requiere, en primer lugar, de personal experto, sobre todo para la distinción de los caracteres morfológicos. Algunas especies se caracterizan por presentar un crecimiento lento en medio de cultivo y, en ocasiones pueden pasar inadvertidas debido a la invasión de otras especies de crecimiento más rápido (Aroca & Raposo, 2007; Tello *et al.*, 2009). La morfología de las esporas y las células conidiógenas es un carácter fundamental para identificar correctamente las especies. Sin

embargo, la esporulación de algunos de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en medio de cultivo no es siempre posible. En los casos de las especies de Basidiomicetos no hay esporulación (*Fomitiporia* spp., *Stereum hirsutum*).

El desarrollo de las técnicas de biología molecular basadas en la amplificación por PCR (*Polymerasa Chain Reaction*) y su aplicación a estos estudios durante los últimos años ha supuesto un avance muy importante en la labor de aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos asociados a los decaimientos de la vid. Sin duda, la región de ADN más utilizada para diferenciar los distintos aislados de hongos ha sido la región codificante para los ARNs ribosómicos (White *et al.*, 1990) porque presenta diferentes tasas de evolución. Las regiones existentes entre los genes ribosomales, regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) son las que evolucionan más rápidamente y han sido empleadas en el análisis de secuencias de especies próximas de los hongos asociados a los decaimientos de la vid (Mostert *et al.*, 2003; Martín & Cobos, 2007; Sánchez-Torres *et al.*, 2008) e incluso en el análisis de variedades dentro de una misma especie (Cobos & Martín, 2008). Pero cada vez es más habitual el empleo de secuencias de otros genes para resolver controversias a nivel intra-genérico, especialmente entre taxones estrechamente relacionados. Las regiones más utilizadas en comparación con las regiones ITS son los genes de la β -tubulina, la actina y el factor de elongación 1- α (FE1- α) (Phillips *et al.*, 2005; Alaniz *et al.*, 2007; Essakhi *et al.*, 2008).

Otras técnicas aplicadas para la identificación de las especies de los hongos asociados a los decaimientos de la vid se basan en la amplificación de un fragmento de ADN que posteriormente se somete a digestión con distintas endonucleasas. Esta técnica permite establecer patrones de bandas característicos de cada especie y ha sido diseñada para diferenciar especies de la familia Botryosphaeriaceae (Alves *et al.*, 2005) y el género *Phaeoacremonium* (Aroca & Raposo, 2007).

La comparación de múltiples secuencias de aislados de una misma especie permite identificar el grado de homología intra-específica. Esta metodología ha sido empleada para diseñar oligonucleótidos específicos que reconocen el ADN de un patógeno determinado. En la última década se han

propuesto numerosos pares de los oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente por PCR convencional los hongos asociados con mayor frecuencia a los decaimientos de la vid. La mayoría de ellos han sido diseñados en la región ITS (Tegli *et al.*, 2000; Groenewald *et al.*, 2000; Lecomte *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 2006; Dubrovsky & Fabritius, 2007; Alaniz *et al.*, 2009); aunque también se han propuesto oligonucleótidos diseñados en los genes de la β -tubulina y la actina (Mostert *et al.*, 2006). Los marcadores moleculares basados en la amplificación al azar de polimorfismos de ADN o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) también han sido utilizados para generar oligonucleótidos específicos utilizados en la identificación de hongos asociados a los decaimientos de la vid (Pollastro *et al.*, 2001).

Los avances en biología molecular han mostrado resultados prometedores en la clasificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en distintos niveles taxonómicos. Los resultados obtenidos promueven de forma continuada la reclasificación de algunas de las especies y la descripción de nuevos hongos patógenos asociados a los decaimientos de la vid (Petit & Gubler, 2005; Mostert *et al.*, 2005 y 2006; Burgess *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2005 y 2007; Essakhi *et al.*, 2008; Schroers *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009a).

Por ello, para avanzar en el conocimiento de los decaimientos de la vid es necesario mantener una amplia colección de aislados fúngicos bien etiquetados, que permitan estudiar en el futuro la homología intra-específica de las diferentes regiones genómicas de interés.

El objetivo del capítulo 1 de esta memoria es mostrar la evolución de los decaimientos de la vid en Castilla y León mediante prospecciones de campo. A partir de la recogida de muestras y el aislamiento e identificación de las especies de hongos asociadas a éstas enfermedades se ofrece una visión general sobre la distribución de las diferentes especies fúngicas en función de distintas características de la planta de vid.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León

El grupo de hongos de la vid del ITACyL ha realizado un seguimiento de la incidencia de yesca y eutipiosis, en la comunidad de Castilla y León durante un periodo de 10 años (2000-2010). Para el seguimiento se seleccionaron 18 parcelas ubicadas en parcelas pertenecientes a seis de las nueve denominaciones de origen de la región (Tabla 1.2.1). En cada parcela se anotó la sintomatología foliar de unas 1000 plantas. Las prospecciones se realizaron en dos épocas del año: entre mayo y junio, durante el estado fenológico H (botones florales separados), para observar la sintomatología de tipo eutipiosis; y en el mes de agosto cuando las cepas alcanzaron el estado fenológico M2 (pleno envero), para determinar la presencia de síntomas de yesca.

Tabla 1.2.1. Parcelas muestreadas a lo largo de este estudio.

Denominación de origen	Localidad	Nº de parcelas
Ribera de Duero	Pedrosa del Rey (Burgos)	1
	La Horra (Burgos)	1
	Sotillo de la Ribera (Burgos)	1
	Peñafiel (Valladolid)	1
Cigales	Cigales (Valladolid)	2
	Dueñas (Palencia)	1
	Valoria la Buena (Valladolid)	1
Toro	Villaester (Zamora)	1
	El Pego (Zamora)	1
	Llano de Morales (Zamora)	1
Rueda	Rueda (Valladolid)	2
	La Seca (Valladolid)	1
Tierra del vino de Zamora	Jambrina (Zamora)	1
	Villanueva de Campean (Zamora)	2
Tierra de León	Valderas (León)	1

1.2.2. Muestras de *Vitis vinifera*

Durante las prospecciones anuales de seguimiento de la incidencia de enfermedades fúngicas de la vid en Castilla y León, se recogieron cepas afectadas por yesca y/o eutipiosis para su posterior análisis en el laboratorio.

Así mismo se realizaron numerosas salidas eventuales a otros viñedos que permitieron incrementar el tamaño del muestreo.

Para cada cepa se anotó el tipo de sintomatología externa en el momento de su recogida en el campo. Las plantas jóvenes con crecimiento débil, hojas pequeñas y cloróticas y agostamiento prematuro o lesiones radiculares fueron consideradas como afectadas por la enfermedad de Petri o pie negro. Las plantas adultas con pocos brotes, sarmientos de escaso desarrollo, y hojas pequeñas y cloróticas se diagnosticaron como afectadas por eutipiosis. Aquellas con hojas de normal desarrollo y decoloraciones internerviales bordeadas por una franja amarillenta o rojiza y las plantas con síntomas de apoplejía se clasificaron como afectadas por yesca. Esta información fue contrastada con los síntomas internos de la madera observados al realizar el análisis y procesamiento de las muestras en el laboratorio. Se definió una cuarta categoría catalogada con el nombre de “otros síntomas” para las plantas con síntomas no específicos en madera, que no fue posible clasificar en alguna de las patologías anteriores.

El número total de plantas muestreadas fue de 415, pertenecientes a siete variedades de uva diferentes: Tempranillo, Garnacha, Viura, Prieto Picudo, Juan García, Syrah y Verdejo. Las muestras provenían en su mayoría de viñedos de Castilla y León (348), y de otras regiones vitivinícolas españolas como Extremadura, Castilla La Mancha, La Rioja, Navarra, País Vasco, Galicia, Andalucía y Valencia. La edad de las plantas muestreadas fue variable y no siempre conocida, obteniéndose un total de 170 plantas jóvenes (de cinco años o menos) y 161 plantas adultas (de más de cinco años).

1.2.3. Procesamiento y análisis de las muestras

Para realizar los aislamientos, las muestras fueron lavadas superficialmente con agua, lejía y jabón durante 5 minutos, seguidas de tres lavados con agua destilada. A continuación, se realizaron cortes transversales a distintas alturas de la planta diferenciándose cinco niveles: raíz, inserción de la raíz, madera del portainjerto, zona del injerto y madera de la variedad. Los cortes fueron desinfectados por inmersión en una solución de lejía al 50% durante 5 minutos seguida de tres lavados en agua estéril de 5-10 minutos. De

cada uno de los cortes transversales se recuperaron astillas de distintas zonas de interés, algunas presentaron claros síntomas de necrosis, otras se correspondieron con madera blanda y otras zonas se mostraron aparentemente sanas. Las astillas se sembraron en placas con medio MEA: Agar Extracto de Malta (preparado de Merk 35 g, en 750 ml de H₂O destilada) y se incubaron en oscuridad a 25 °C. Las colonias fúngicas crecidas se repicaron a medio PDA: Agar Patata Dextrosa (preparado de Merk 25 g en 750 ml de H₂O destilada) y se incubaron nuevamente a 25 °C con 12 horas de fotoperiodo con luz ultravioleta para favorecer su esporulación. Los medios fueron suplementados con Dieldrín (0,2 g/l, Sigma) y Cloranfenicol (0,25 g/l, Merk).

De cada uno de los aislados de interés se obtuvieron cultivos monospóricos aplicando 100 µl de agua destilada estéril sobre el micelio y realizando diluciones seriadas o recuperando las esporas de los picnidios formados sobre madera previamente esterilizada y puesta en el medio de cultivo. Los aislados fúngicos y sus monospóricos entraron a formar parte de la colección de hongos del ITACyL. Para ello, se les asignó un número de colección y fueron conservados en tres formas: micelio liofilizado a -20 °C, solución de esporas en glicerol al 50% a -20 °C y un cultivo a 4 °C repicado periódicamente en medio PDA. Estos aislados fueron utilizados posteriormente en los diferentes estudios.

1.2.4. Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó en base a la morfología del micelio, la coloración de la colonia en PDA, la tasa de crecimiento, y la observación de las esporas y las células conidiógenas en preparación microscópica (Nikon 501-DSIF1).

1.2.5. Identificación molecular

Para confirmar las identificaciones morfológicas se emplearon métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos universales y posterior análisis de los amplímeros obtenidos o con oligonucleótidos específicos.

1.2.5.1. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de micelio fresco crecido en placa Petri a 25 °C en medio PDA, utilizando el kit comercial REDExtract-N-Amp (XNAP) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

1.2.5.2. Amplificación por PCR

Para identificar las distintas especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid se llevaron a cabo dos tipos de amplificaciones:

i. Amplificación con oligonucleótidos universales

Se amplificaron tres regiones diferentes del genoma: la región que codifica los ARN ribosómicos y las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) situadas entre ellos; el gen de la β -tubulina y el gen que codifica para el factor de elongación 1- α (FE1- α). La Figura 1.2.1 muestra una representación esquemática de cada una de estas regiones y la localización de los pares de oligonucleótidos universales empleados en este trabajo.

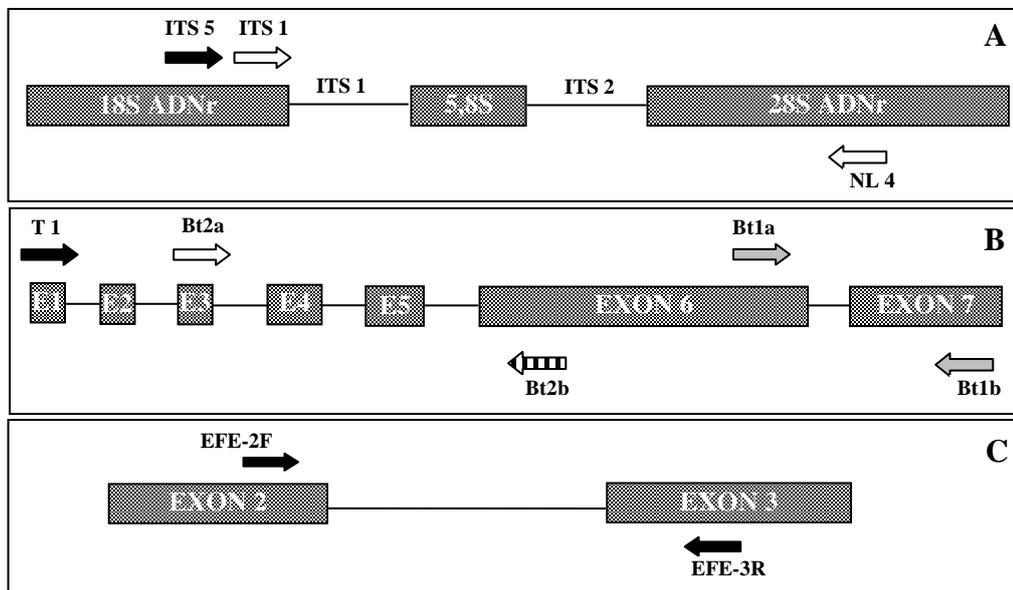


Figura 1.2.1. A: Representación esquemática de una unidad de ADN r y localización de los pares de oligonucleótidos ITS1 y NL4 empleados en la identificación de Botryosphaeriaceae; e ITS5 e ITS4 utilizados para la identificación de los aislados fúngicos. B: Representación esquemática de la región parcial del gen de la β -tubulina y localización de los pares de oligonucleótidos T1 y Bt2b, utilizados en la identificación de especies del género *Phaeoacremonium*; Bt2a y Bt2b, utilizados en la identificación de Botryosphaeriaceae; Bt1a y Bt1b, utilizados en la identificación de especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*. C: Representación esquemática de la región parcial del FE 1- α y localización de los iniciadores EFE-2F y EFE-3R utilizados en la identificación de Botryosphaeriaceae.

Los amplímeros obtenidos requieren diferentes análisis posteriores para identificar a nivel de especie los aislados fúngicos.

-ITS1 y NL4. La amplificación con los oligonucleótidos ITS1 (White *et al.*, 1990) y NL4 (O'Donell, 1993) proporciona un fragmento de 1200 pb que comprende la región ITS1, el ADNr 5,8S, la región ITS2 y los dominios D1/D2 del ADN ribosómico 28S (Figura 1.2.1 A). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 20 µl utilizando 1× REDExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos y 2 µl del extracto de ADN. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 1.2.2. La identificación de cuatro especies de la **familia Botryosphaeriaceae** (*Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Neofussicoccum parvum* y *Botryosphaeria dothidea*) se realizó mediante digestión del fragmento ITS1-NL4 con enzimas de restricción. Para ello se utilizaron las endonucleasas *TaqI*, *BsuRI*, *SauI* (Bioton GmbH, Ludwingshagen, Germany) y *AluI* (Biotools Biotechnological and Medical Laboratories S.A., Madrid, Spain) siguiendo el método descrito inicialmente por Alves *et al.*, (2005) y empleado previamente por el grupo de hongos de la vid del ITACyL (Martín & Cobos, 2007; Cobos, 2008).

-ITS5 e ITS4. La amplificación llevada a cabo con los oligonucleótidos universales ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990) (Figura 1.2.1 A) se preparó en un volumen final de 30 µl utilizando 1x REDExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y aproximadamente 2 µl de ADN genómico, siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 1.2.2. El fragmento amplificado fue posteriormente secuenciado (ver apartado 1.2.5.5) y sometido a un análisis BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para establecer la especie con la que compartían el mayor número de nucleótidos, considerando una identificación definitiva cuando los porcentajes de homología estaban comprendidos entre el 98 y el 100%. Éste procedimiento fue empleado en la identificación de algunas especies de la **familia Botryosphaeriaceae** y de los géneros *Phaeoacremonium* y *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*, además de *Phomopsis viticola* y *Cadophora luteo-olivacea*. El análisis de la región ITS5-ITS4 se

utilizó también para confirmar la identificación de las especies *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* y *Cryptovalsa ampelina*.

-T1 y Bt2b. En la identificación de las especies del género *Phaeoacremonium* (distintas de *Pm. aleophilum*) se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores T1 (O'Donnell & Cigelinik, 1997) y Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) que amplifican la región comprendida entre el exón 1 y el inicio del exón 6 del gen de la β -tubulina (Figura 1.2.1 B). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 30 μ l utilizando 1x REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 μ M de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 2 μ l del extracto de ADN. La Tabla 1.2.2 muestra la secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación. Las secuencias del amplímero T1-Bt2b fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank mediante un análisis BLASTN según se ha descrito en el párrafo anterior.

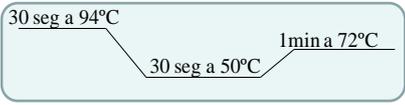
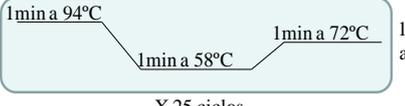
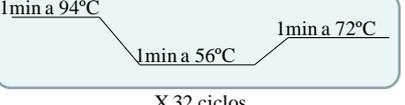
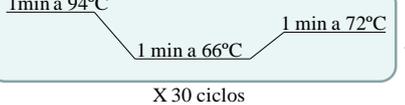
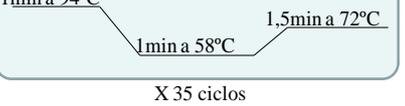
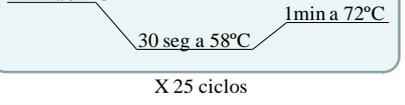
-Bt2a y Bt2b. En la amplificación parcial del gen de la β -tubulina de las especies de la familia **Botryosphaeriaceae** se utilizaron los oligonucleótidos Bt2a y Bt2b (Glass & Donaldson, 1995), que amplifican la región comprendida entre el exón 3 y el inicio del exón 6 (Figura 1.2.1 B). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 30 μ l utilizando 1x REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 μ M de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 2 μ l de ADN genómico. Las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 1.2.2. Con el fragmento amplificado y secuenciado se realizó un análisis BLASTN para identificar la especie de los aislados.

-Bt1a y Bt1b. Para la identificación de *Cylindrocarpon / Ilyonectria spp.* se amplificó otra región parcial del gen de la β -tubulina. Para ello se emplearon los oligonucleótidos Bt1a y Bt1b (Glass & Donaldson, 1995) que amplifican el extremo final del exón 6 y el inicio del exón 7 del gen de la β -tubulina (Figura 1.2.1 B). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 30 μ l utilizando 1x REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,6 μ M de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 2 μ l de ADN y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 1.2.4.

En este caso, además de realizar un análisis BLASTN, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético con las distintas especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*. Las secuencias obtenidas fueron editadas con Chromas v 1.45 (Conor McCarthy, School of Health Sciences Griffith University, Southport, Australia) y alineadas con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Posteriormente, se calcularon las distancias genéticas con el modelo 2-parámetros de Kimura que asume que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma y que la tasa de sustitución no varía entre sitios (Kimura, 1980). A continuación, se efectuó un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones y se construyó un árbol filogenético utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) con el programa MEGA versión 5.02 (Tamura *et al.*, 2011). Para la construcción del análisis filogenético se eligieron 52 aislados de la colección representativos de las distintas especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* y se incluyeron cinco secuencias de la base de datos GenBank: *I. liriodendri* AY997586 y EF445665; *I. macrodidyma* AY997603 y EF445658; y *Botryotinia fuckeliana* U27198 incluida como outgroup. Los aislados de referencia CBS120170 (*I. macrodidyma*) y CBS119.41 (*C. destructans*) también fueron secuenciados e incluidos en el análisis filogenético.

-EFE-2F y EFE-3R. Para la correcta identificación de algunas especies de la familia **Botryosphaeriaceae** fue necesario recurrir a la amplificación parcial del gen FE1- α utilizando los oligonucleótidos iniciadores EFE-2F y EFE-3R (Cobos & Martín, 2008) (Figura 1.2.1 C). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 30 μ l utilizando 1x REDEExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 μ M de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 2 μ l del extracto de ADN fúngico y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 1.2.2. Seguidamente se realizó un análisis BLASTN siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 1.2.2. Secuencias de los oligonucleótidos universales y condiciones de amplificación por PCR empleadas en la identificación molecular.

REGIÓN TAMAÑO (pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS (5'→ 3')		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	
ITS (1200)	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG NL4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	5min a 95°C		10 min a 72°C
			X 30 ciclos	
ITS (~550)	ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	5min a 95°C		10 min a 72°C
			X 25 ciclos	
β -tubulina (~600)	T1 AACATGCGTGAGATTGTAAGT Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	5min a 95°C		10 min a 72°C
			X 32 ciclos	
β -tubulina (~410)	Bt2a GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	3min a 94°C		5 min a 72°C
			X 30 ciclos	
β -tubulina (~500)	Bt1a TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG Bt1b GACGAGATCGTTTCATGTTGAACTC	4min a 94°C		10 min a 72°C
			X 35 ciclos	
FE1- α (~430)	EFE-2F TGATCTACAAGTGCGGTGGT EFE-3R GGGCGATATCGATGGTGATA	5min a 95°C		10 min a 72°C
			X 25 ciclos	

ii. Amplificación con oligonucleótidos específicos

La identificación de varias especies asociadas a los decaimientos se ha realizado de forma rápida empleando oligonucleótidos específicos previamente descritos en la bibliografía:

-Pch1 y Pch2. Para identificar *Phaeomoniella chlamydospora* se utilizaron los oligonucleótidos específicos Pch1 y Pch2 diseñados en la región ITS por Tegli *et al.* (2000) para reconocer un fragmento de 380 pb. La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l conteniendo tampón de PCR 1 \times , preparado a partir de tampón 10 \times proporcionado con la DNA polimerasa, 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 μ M de cada uno de los oligonucleótidos y aproximadamente 2 μ l de ADN genómico.

-Pal 1N y Pal2. Estos oligonucleótidos reconocen específicamente un fragmento de 395 pb de *Phaeoacremonium aleophilum* mediante anillamiento en la región ITS (Tegli *et al.*, 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 10 µl utilizando 1x Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 1 µl del extracto de ADN fúngico.

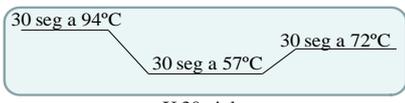
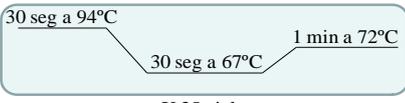
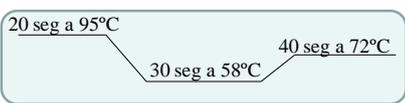
-Fmed F y Fmed R1. Pollastro *et al.* (2001) emplearon la técnica SCAR (Sequence-Characterised Amplified Region) para diseñar dos pares de oligonucleótidos iniciadores que reconocen específicamente *Fomitiporia mediterranea*. En este trabajo se emplearon dos de los oligonucleótidos específicos propuestos por Pollastro *et al.* (2001) (Tabla 1.2.3) para amplificar un fragmento de 581 pb. La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 10 µl conteniendo 1x REExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 1,5 µl de ADN.

-Lata 1 y Lata 2.2. Los aislados de la especie *Eutypa lata* fueron identificados mediante amplificación específica de un fragmento de 385 pb en la región ITS con los oligonucleótidos Lata1 y Lata 2.2 (Lecomte *et al.*, 2000). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 µl conteniendo tampón de PCR 1x, preparado a partir de tampón 10x proporcionado con la enzima, 2mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,5 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y aproximadamente 2 µl de ADN genómico.

-Camp-1 y Camp-2R. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para reconocer específicamente un fragmento de 300 pb en la región ITS de *Cryptovalsa ampelina* (Luque *et al.*, 2006). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 µl utilizando 1x Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 2 µl de ADN genómico.

Las condiciones de amplificación y la secuencia de todos los oligonucleótidos específicos empleados en este trabajo se muestran en la Tabla 1.2.3.

Tabla 1.2.3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos y condiciones de amplificación por PCR empleadas en la identificación molecular de *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* y *Cryptovalsa ampelina*.

ESPECIE	REGIÓN TAMAÑO (pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS (5' → 3')	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN
<i>Pa. chlamydospora</i>	ITS (380)	Pch1 CTCCAACCCTTTGTTTATC Pch2 TGAAAGTTGATATGGACCC	3min a 95°C  X 30 ciclos 5 min a 72°C
<i>Pm. aleophilum</i>	ITS (395)	Pal 1N AGGTCGGGGGCAAC Pal2 AGGTGTAACTACTGCGC	3min a 95°C  X 35 ciclos 5 min a 72°C
<i>F. mediterranea</i>	OPA2 ₆₇₃ (581)	Fmed F CAGTCCACTTCATAATAACC Fmed R1 GCTCTATTGTCCATAAACG	4min a 95°C  X 30 ciclos 7 min a 72°C
<i>E. lata</i>	ITS (385)	Lata1 GAGCTACCCTGTAGCCCGCTG Lata2.2 GACGTCAGCCGTGACACACC	3min a 94°C  X 35 ciclos 5 min a 72°C
<i>C. ampelina</i>	ITS (300)	Camp-1 CCTACCCTGTAGCTACCCTA Camp-2R CAGCGTCTATAGCTAGGCGA	3min a 95°C  X 35 ciclos 5 min a 72°C

Todos los oligonucleótidos iniciadores (universales y específicos) fueron suministrados por IZASA (Barcelona, España). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en los termocicladores Gene Amp[®] 7200 y/o Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

1.2.5.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v (Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU) en tampón TBE 1x (TBE 10x: 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA a pH 8, ajustado a un volumen final de un litro y pH 8,3). Los patrones resultantes de la digestión del amplímero ITS1-NL4 con endonucleasas se separaron en un gel

de agarosa al 3%. Como marcador de peso molecular se empleó el PCR Marker 50-2000 pb (Sigma). Para visualizar los fragmentos amplificados los geles se tiñeron en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,2 ng/ml) durante 15 minutos y posteriormente fueron iluminados con luz ultravioleta. La imagen fue captada con la ayuda del programa gelDoc 1000 (Bio-Rad).

1.2.5.4. Purificación y cuantificación de los amplímeros

Para la secuenciación, los fragmentos en solución se purificaron con GFX PCR DNA Purification kit (Amersham Biosciences GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La concentración de los fragmentos amplificados y purificados se cuantificó midiendo la densidad óptica a una absorbancia de 260 nm con NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware Estados Unidos). La calidad del ADN se determinó por medida de la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm considerándose preparaciones puras valores cuyo cociente fue próximo a 1,8.

1.2.5.5. Secuenciación

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para la reacción de secuenciación se utilizó DYEnamic ET Dye Terminator kit (MegaBACE, Amersham). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200. Los fragmentos de ADN se analizaron en un secuenciador MegaBACE 500 (Amersham).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Incidencia de yesca y eutipiosis en Castilla y León

Los datos de las prospecciones realizadas en las distintas denominaciones de origen de Castilla y León durante los años 2000 a 2007 mostraron una evolución creciente de la incidencia de yesca y eutipiosis en la región. Estos resultados han sido previamente detallados en profundidad (Cobos, 2008). Los datos expuestos a continuación hacen referencia a los resultados obtenidos en el periodo 2007-2010.

La incidencia de eutipiosis durante esos años se calculó en 11% en 2007, 9,9% en 2008, 4,5% en 2009 y 5,6% en 2010. La incidencia de yesca en el periodo estudiado fue de 10,3% en 2007, 3,4% en 2008 y 2009 y 5,2% en 2010. Los datos obtenidos se representan en la Figura 1.3.1.

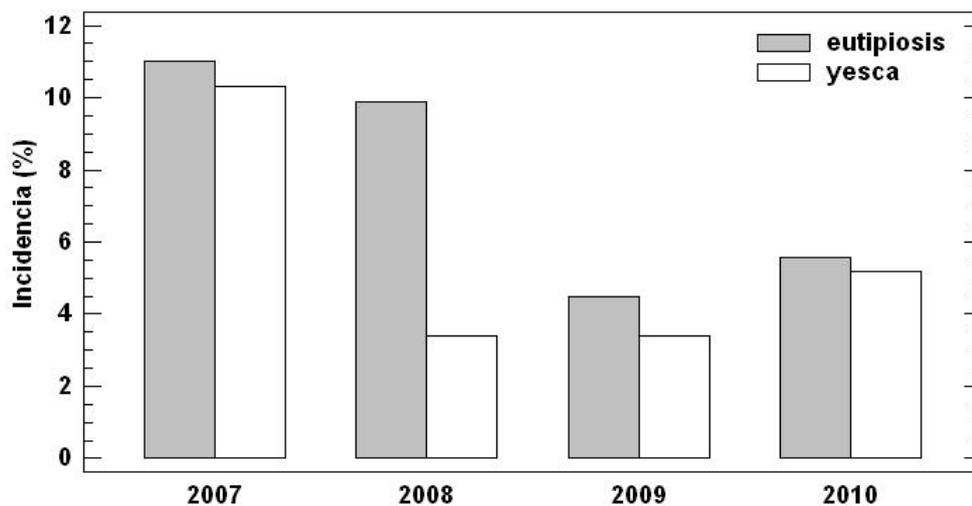


Figura 1.3.1. Incidencia (%) de eutipiosis y yesca en Castilla y León durante los años 2007-2010.

El valor más elevado de incidencia de las dos enfermedades en Castilla y León se ha registrado en el año 2007. En general, la incidencia de la sintomatología de eutipiosis es mayor en nuestra región, este hecho se observó principalmente en las prospecciones realizadas en el año 2008. Aunque durante el año 2009 la incidencia de yesca y eutipiosis decreció, los datos obtenidos en el último año de muestreo indican que lejos de erradicarse, la incidencia de ambas sintomatologías supera todavía el 5%.

Por denominaciones de origen, existen importantes diferencias en cuanto a los porcentajes de incidencia observados. La Figuras 1.3.2 y 1.3.3 muestran la incidencia de eutiposis y yesca respectivamente, calculada para las seis denominaciones de origen estudiadas de 2007 a 2010. Excepcionalmente las prospecciones correspondientes a la valoración de yesca y eutiposis en Rueda, así como la de sintomatología de eutiposis en la D.O. Tierras de León no pudieron realizarse en 2007 debido a las condiciones climatológicas.

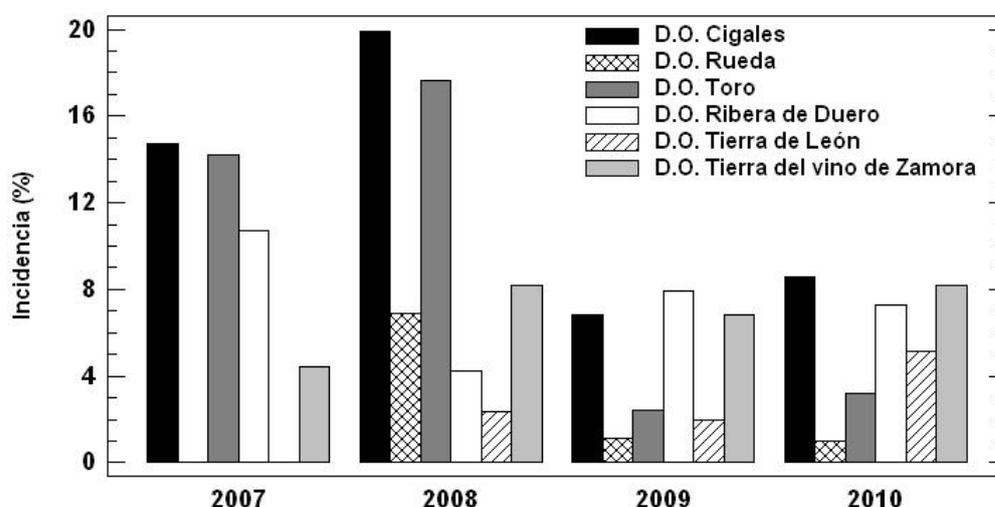


Figura 1.3.2. Incidencia de eutiposis (%) en seis DD.OO. de Castilla y León durante el periodo 2007-2010.

La incidencia de eutiposis ha sido mayor en las denominaciones de origen Cigales y Toro, especialmente durante los años 2007 y 2008. En las DD.OO. Ribera de Duero y Tierra del vino de Zamora la incidencia de esta sintomatología se mantiene estable en torno al 7-8% en los dos últimos años. En la zona de Rueda se ha observado un decrecimiento de la incidencia de eutiposis, situándose en el 1% en los últimos años de prospección. Por el contrario en la parcela de la D.O. Tierra de León se ha observado un incremento de la incidencia de eutiposis, alcanzando el 5% en el año 2010.

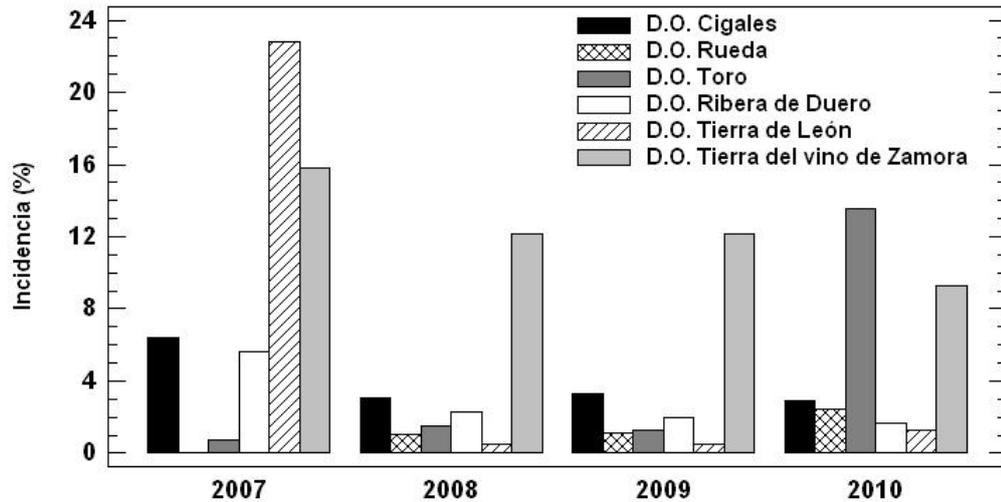


Figura 1.3.3. Incidencia de yesca (%) en seis DD.OO. de Castilla y León durante el periodo 2007-2010.

La distribución de la incidencia de yesca en la comunidad de Castilla y León se muestra irregular entre las zonas estudiadas. Destaca el casi 23% de incidencia observado en la parcela ubicada en la D. O. Tierra de León durante el año 2007. Esta situación llevó al agricultor a arrancar casi el 50% de su plantación; lo que explica el decrecimiento de la incidencia en los años sucesivos. Las DD.OO. Cigales, Ribera de Duero y Tierra del Vino de Zamora han experimentado un ligero descenso en la incidencia de yesca desde el año 2007 al 2010. Sin embargo la incidencia en la D. O. Tierra del Vino de Zamora todavía presenta valores elevados (9,3% en 2010). Las prospecciones realizadas en las DD.OO. Rueda y Toro han mostrado una tendencia al alza en la incidencia de yesca durante el último año de estudio. Este es un dato preocupante especialmente en la zona de Toro, dónde la incidencia superó el 13% en 2010.

1.3.2. Identificación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León

A partir de las 415 muestras de vid analizadas se han aislado 1319 hongos que han sido incluidos en la colección del ITACyL. Mediante el estudio morfológico (Figura 1.3.5) se han identificado un total de 1218 hongos asociados a los decaimientos de la vid.

Los aislados de la familia Botryosphaeriaceae han sido mayoritarios, presentes en el 39,3% de las cepas analizadas, seguidos por *Phaeoconiella chlamydospora* que ha sido aislado en el 23,1% de las cepas analizadas y los géneros *Phaeoacremonium* y *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* aislados en el 19% de las muestras analizadas, en ambos casos. Las especies: *Phomopsis viticola*, aislada en el 3,6% de las plantas analizadas, *Fomitiporia mediterranea* en el 4,8% y *Eutypa lata* en el 1,9% de las muestras de vid se consideraron minoritarias. También se obtuvieron aislamientos esporádicos de las especies: *Stereum hirsutum* en el 0,5% de las plantas muestreadas, *Cryptovalsa ampelina* en el 0,2%, y *Cadophora luteo-olivacea* en el 1,2% de las plantas de vid; agrupadas en la columna de otros (Figura 1.3.4).

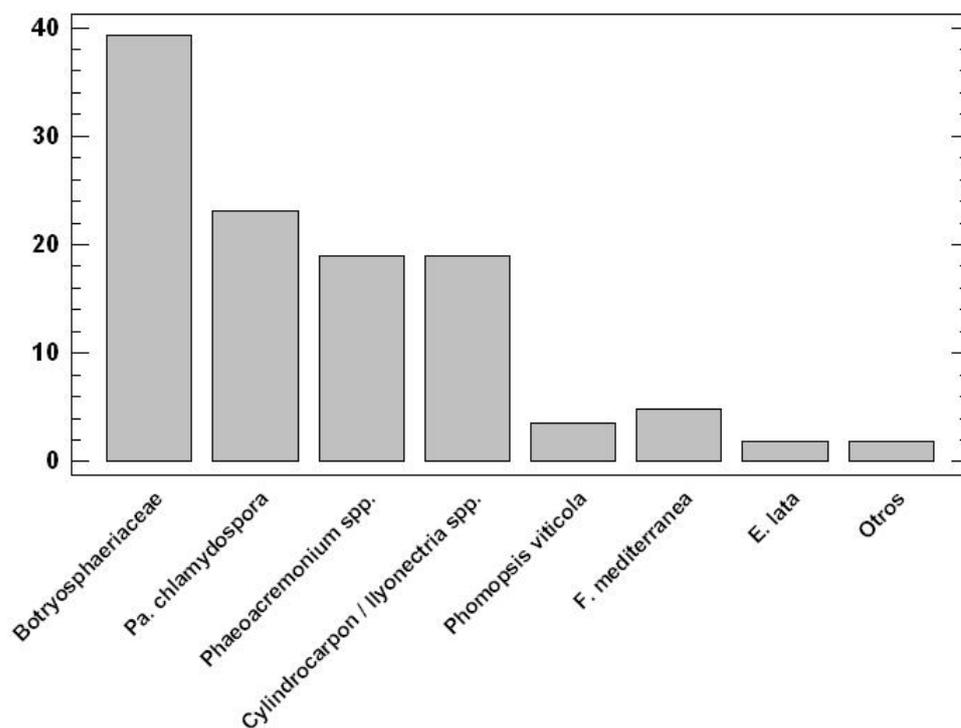


Figura 1.3.4. Porcentaje de 415 muestras de vid de las cuáles se aislaron hongos asociados a los decaimientos de la vid. Las columnas agrupan todos los aislados (1218) identificados mediante criterios morfológicos a nivel de familia, género o especie. La columna "otros" representa de modo conjunto las especies *S. hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

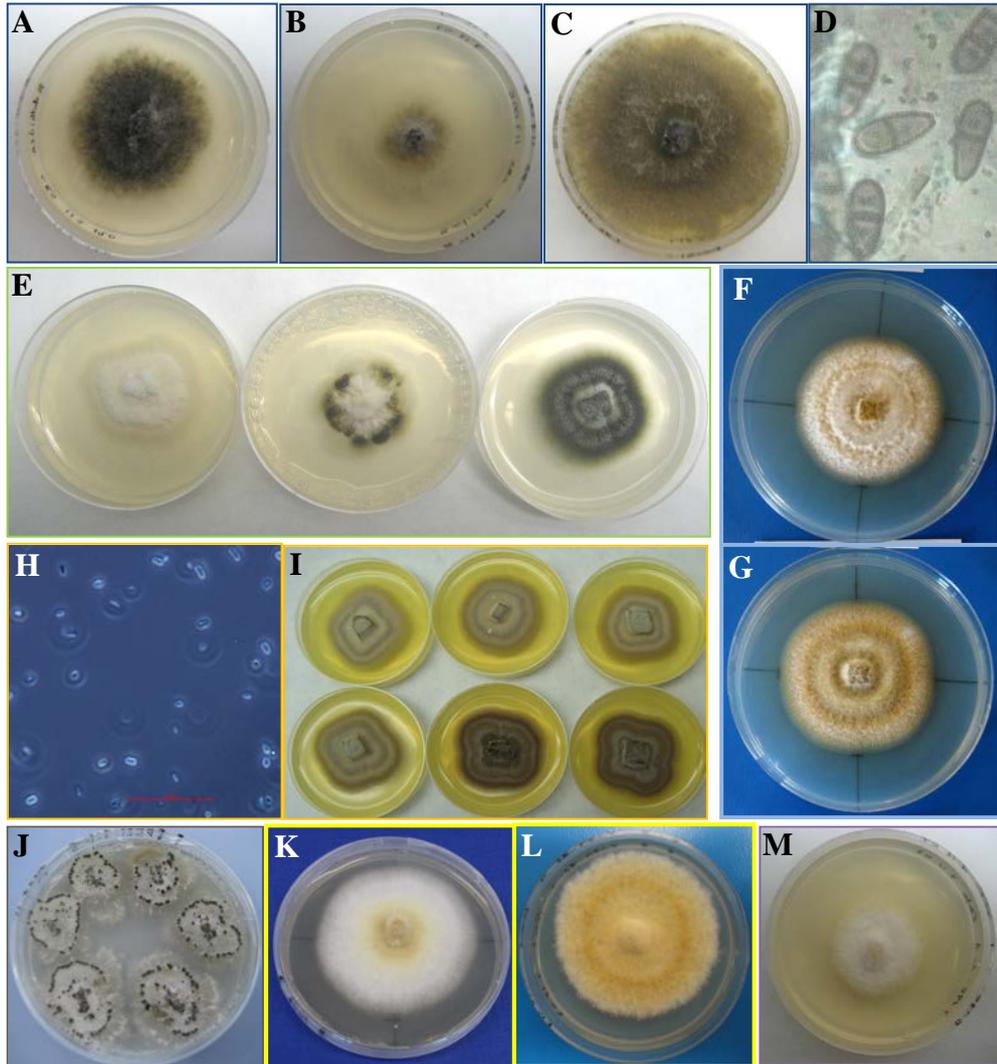


Figura 1.3.5. Características morfológicas (en medio PDA) de los hongos mayoritarios asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León. **A-C:** Micelio de Botryosphaeriaceae spp. **D:** Morfología de las esporas de *Do. sarmentorum* (400x). **E:** Micelio de *Phaeoaniella chlamydospora*, **F y G:** Micelio de *Cyindrocarpon / Ilyonectria* spp. **H:** Conidios de *Phaeoacremonium aleophilum* (400x). **I:** Micelio de *Phaeoacremonium aleophilum*. **J:** Micelio y picnidios de *Phomopsis viticola*. **K y L:** Micelio de *F. mediterranea*. **M:** Micelio de *E. lata*.

La utilización de diferentes técnicas moleculares ha permitido identificar los aislados obtenidos a nivel de especie. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

1.3.2.1. Especies de la familia Botryosphaeriaceae

El 39% de las muestras de vid analizadas proporcionaron 563 aislados asignados por criterios morfológicos a la familia Botryosphaeriaceae. De ellos, un total de 441 han sido identificados a nivel de especie mediante técnicas moleculares. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de diez especies distintas en la comunidad de Castilla y León (Figura 1.3.6).

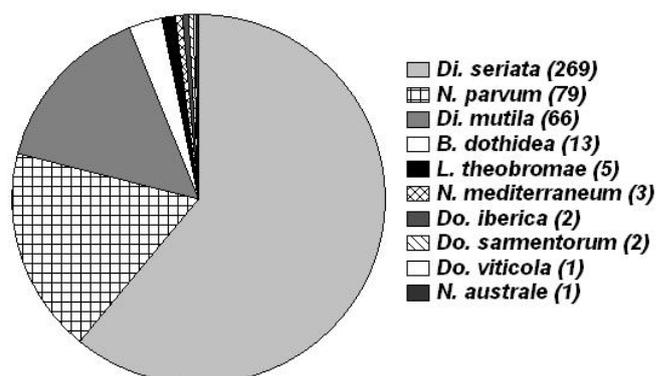


Figura 1.3.6. Número de aislados de las diez especies de la familia Botryosphaeriaceae identificados en este trabajo.

La utilización de enzimas de restricción fue una buena técnica en la identificación de las cuatro especies mayoritarias: *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Di. mutila* y *Botryosphaeria dothidea*.

El análisis de los patrones de restricción no permitió obtener una identificación definitiva de otras especies minoritarias *Dothiorella sarmentorum*, *Do. iberica* y *Do. viticola* (Cobos, 2008). Para la identificación de éstas y otras especies minoritarias se recurrió a la amplificación parcial y posterior secuenciación de la región ITS (con los oligonucleótidos ITS5/ITS4), el gen de la β -tubulina (con los oligonucleótidos Bt2a/Bt2b) y el FE1- α (con los oligonucleótidos EFE-2F y EFE-3R). La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank permitió identificar seis especies minoritarias: *Lasiodiplodia theobromae* (*Botryosphaeria rhodina*), *N. mediterraneum*, *Do. iberica*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola* y *N. australe*.

Nueve de las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 1.3.1.

Tabla 1.3.1. Números de acceso proporcionados por la base de datos GenBank para las secuencias amplificadas de tres aislados de las especies *L. theobromae*, *N. mediterraneum* y *N. australe*. *: Aislado Vc-12-3-5 *B. rhodina*.

Especie	Aislado	Nº GenBank	Nº GenBank	Nº GenBank
		ITS	β -tubulina	EF1- α
<i>L. theobromae</i>	Y501-03-5*	EU600925	EU597297	EU597298
<i>N. mediterraneum</i>	Y546-02-1	JF437919	JF437921	JF437923
<i>N. australe</i>	Y264-21-1	JF437920	JF437922	JF437924

1.3.2.2. *Phaeomoniella chlamydospora*

Se obtuvieron 209 aislados de la especie *Pa. chlamydospora*, de un 23% de las plantas analizadas. La identificación de los aislados de *Pa. chlamydospora* se llevó a cabo mediante caracteres morfológicos (Figura 1.3.5 E).

Esta identificación fue confirmada por amplificación específica de un fragmento de 380 pb utilizando los oligonucleótidos específicos Pch1 y Pch2 diseñados por Tegli *et al.* (2000).

1.3.2.3. *Phaeoacremonium* spp.

Los aislamientos del género *Phaeoacremonium* sumaron un total de 175 aislados obtenidos del 19% de las plantas analizadas. Los aislados del género *Phaeoacremonium* presentaron una gran variabilidad en los caracteres morfológicos que se discuten en el Capítulo 3 de esta tesis. La identificación por PCR con los oligonucleótidos PalN1 y Pal2 fue positiva para 171 aislados, proporcionando una banda específica de 395 pb. Por lo tanto, 171 aislados del género *Phaeoacremonium* fueron identificados como *Pm. aleophilum*.

La amplificación con los oligonucleótidos PalN1 y Pal2 fue negativa en cuatro casos. Para la identificación de esos aislados se recurrió a la amplificación parcial y posterior secuenciación de la región ITS (con los oligonucleótidos ITS5/ITS4) y el gen de la β -tubulina (con los oligonucleótidos T1/Bt2b). Los resultados del análisis BLASTN obtenidos al comparar las secuencias de la región ITS no fueron concluyentes en la identificación de dos de los aislados.

Sin embargo, las secuencias parciales del gen de la β -tubulina presentaron sendas homologías (99-100%) con secuencias de *Pm. mortoniae*, *Pm. viticola*, *Pm. iranianum* y *Pm. hispanicum*.

Las secuencias de la región ITS y el gen de la β -tubulina de los aislados identificados como *Pm. mortoniae*, *Pm. viticola*, *Pm. iranianum* y *Pm. hispanicum* fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 1.3.2.

Tabla 1.3.2. Números de acceso proporcionados por la base de datos GenBank para las secuencias amplificadas de cuatro aislados del género *Phaeacremonium*.

Especie	Aislado	Nº GenBank ITS	Nº GenBank β -tubulina
<i>Pm. mortoniae</i>	Y270-16-1	JF275862	JF275872
<i>Pm. viticola</i>	Y271-03-1	JF275864	HQ700718
<i>Pm. iranianum</i>	Y277-14-1	JF275863	JF275873
<i>Pm. hispanicum</i>	Y549-09-3	JF275865	HQ700715

1.3.2.4. *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* spp.

A partir del 19% de las cepas analizadas se obtuvieron 131 aislados del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*. Mediante el análisis por PCR utilizando los oligonucleótidos Bt1a y Bt1b que amplifican una secuencia parcial del gen de la β -tubulina, se obtuvieron amplímeros de dos tamaños diferentes (Figura 1.3.7). En 100 de los aislados analizados el producto amplificado fue de ~ 520 pb. Para los 31 aislados restantes se observó un producto de PCR de ~ 470 pb.

La secuenciación de los fragmentos amplificados y posterior comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos GenBank permitió identificar 84 aislados de la especie *I. macrodidyma* (homología del 99%-100% con las secuencias AY997603 y EF445658) y 27 aislados de la especie *I. liriodendri* (identidad del 100% con las secuencias AY997586 y EF445665).

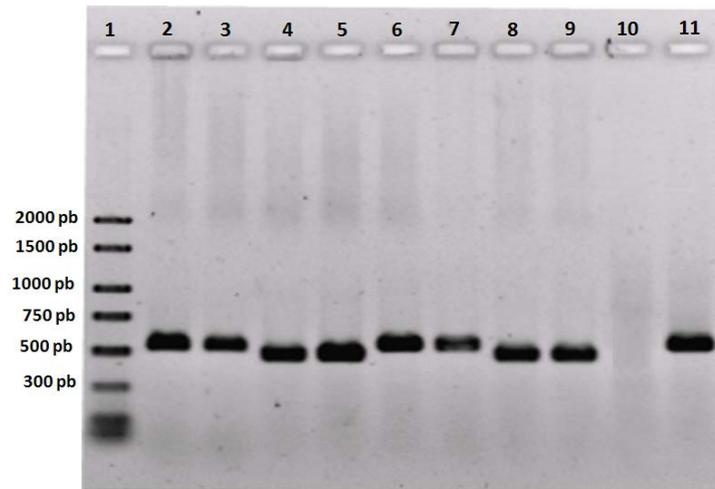


Figura 1.3.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos Bt1a y Bt1b. Marcador de peso molecular (carril 1); *I. macrodidyma* (carriles 2 y 3); *I. liri dendri* (carriles 4 y 5); *C. pauciseptatum* (carriles 6 y 7); *C. olidum* (carriles 8 y 9); control negativo (carril 10); *Phaeoacremonium parasiticum* CBS 113585 (carril 11).

Sin embargo, los resultados comparativos de las secuencias del gen de la β -tubulina con la base de datos, no fueron concluyentes para identificar 20 aislados del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*. En 16 aislados se encontró una identidad del 97% con las secuencias de *C. macrodidyma*, mientras otros cuatro aislados presentaron una identidad del 93% con especies de otros géneros distintos (*Gibberella*, *Nectria*). Para la identificación de dichos aislados se recurrió a la secuenciación de la región ITS con los oligonucleótidos universales ITS5 e ITS4. En base a éstas secuencias se identificó la presencia de *C. pauciseptatum* (16 aislados) y *C. olidum* (4 aislados) (Figura 1.3.8). Dos secuencias de la región ITS fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso EU983277 y EU597299 para *C. pauciseptatum* y *C. olidum*, respectivamente.

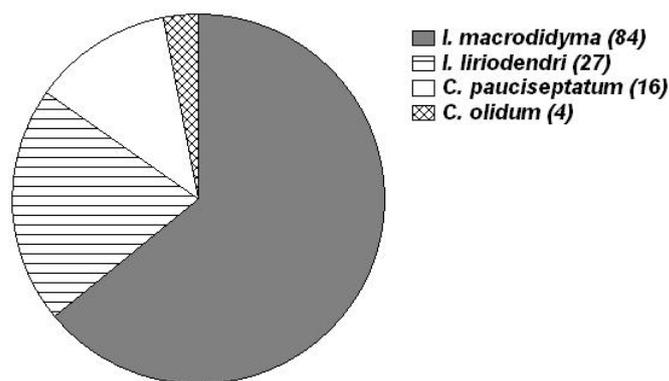


Figura 1.3.8. Número de aislados de las cuatro especies del género *Cyindrocarpon* / *Ilyonectria* identificados en este trabajo.

En el alineamiento de las secuencias amplificadas con los oligonucleótidos Bt1a y Bt1b se observó una inserción de 55 pb para los aislados de la especie *C. pauciseptatum* y de 52 pb para los aislados de la especie *I. macrodidyma*. Ésta inserción se corresponde con un intrón situado entre los exones 6 y 7 (Figura 1.2.1 B). Las otras secuencias, 31 en total, resultaron ser codificantes en su totalidad y se correspondieron con las especies *I. liriodendri* y *C. olidum*.

En el estudio filogenético de estas mismas secuencias, se utilizaron un total de 52 aislados distintos de la colección y dos aislados de referencia: CBS120170 y CBS119.41. En la construcción del árbol se incluyeron 519 nucleótidos de los cuáles 59 fueron variables. La Figura 1.3.9 muestra el árbol filogenético construido con el método NJ en el que se identificaron cuatro clados consistentes.

El primer clado agrupa (con un valor de bootstrap del 100%) 16 aislados de *I. liriodendri* y las secuencias del GenBank AY997586 y EF445665. El segundo clado agrupa tres aislados de la especie *C. olidum* (valor de bootstrap del 100%). El tercer clado (95% de bootstrap) contiene 25 aislados de la colección identificados como *I. macrodidyma*, las secuencias de los aislados de referencia CBS120170 y CBS119.41 y las secuencias del GenBank AY997603 y EF445658. El cuarto clado agrupa las secuencias de seis aislados de la especie *C. pauciseptatum* (valor de bootstrap del 98%).

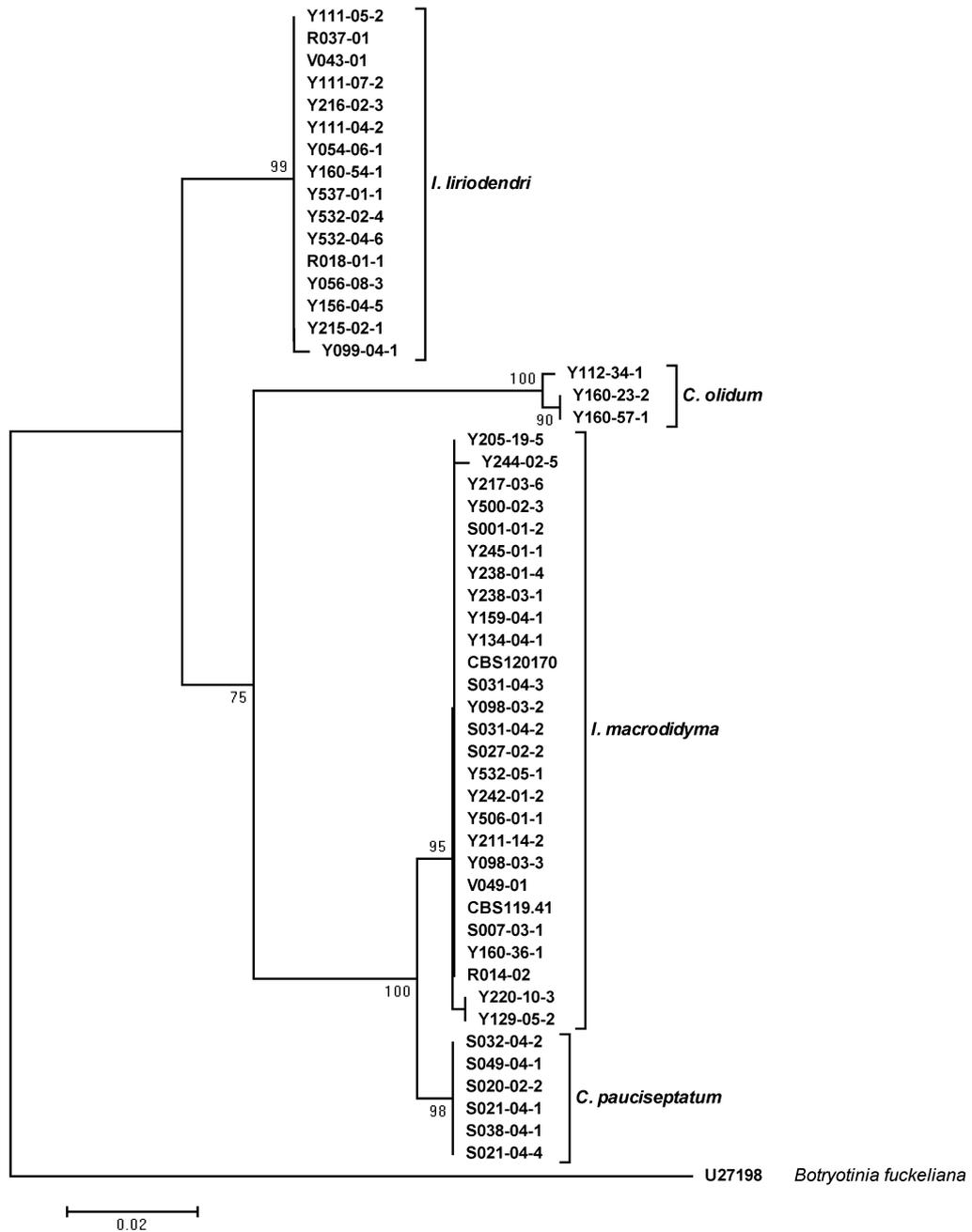


Figura 1.3.9. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias parciales del gen de la β -tubulina de *Cylindrocarpon / Ilyonectria* spp., calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

1.3.2.5. *Phomopsis viticola*

En este trabajo se han identificado un total de 60 aislados de la especie *P. viticola* obtenidos a partir del 3.6% de las 415 muestras de vid analizadas. La identificación de los aislados de *P. viticola* fue realizada en base a sus caracteres morfológicos (Figura 1.3.5 J) y confirmada por métodos moleculares. Se realizó la amplificación y secuenciación de la región ITS con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4. Las secuencias obtenidas presentaron una identidad comprendida entre el 97-99% con las secuencias EU851109 y AY485763 depositadas en la base de datos GenBank como *P. viticola*.

1.3.2.6. *Fomitiporia mediterranea*

A partir del 4,8% de las plantas analizadas se han obtenido 45 aislados de la especie *F. mediterranea*. Los oligonucleótidos específicos diseñados por Pollastro *et al.* (2001) amplificaron específicamente un fragmento de aproximadamente 580 pb en todos los aislados de esta especie. Esta identificación fue confirmada en ocho aislados por amplificación y posterior secuenciación de la región ITS con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 (identidad 96-98% con la secuencia AF515578).

1.3.2.7. *Eutypa lata*

Los aislamientos de la especie *E. lata* sumaron un total de 26 entradas, obtenidas del 1,9% de las plantas analizadas. La identificación de los aislados de *E. lata* fue realizada mediante amplificación específica por PCR de un fragmento de 385 pb con los oligonucleótidos Lata 1 y Lata 2.2. Sin embargo, la amplificación fue exitosa solamente en 18 de los aislados estudiados.

Se realizó un análisis de las secuencias amplificadas con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 de los ocho aislados restantes. Con una identidad del 97-98% con la secuencia DQ006944 depositada en la base de datos GenBank su identidad fue confirmada.

1.3.2.8. Otras especies fúngicas

Además de los hongos descritos en los apartados anteriores se identificaron otros aislados entre los que destacan las especies *Stereum hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

Mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS se identificaron tres aislados de la especie *S. hirsutum* (99% de identidad con la secuencia EU851113).

Un aislado de *Cryptovalsa ampelina* fue identificado mediante caracteres morfológicos y amplificación específica de un fragmento de ~ 300 pb con los oligonucleótidos Camp-1 y Camp-2R. Adicionalmente se realizó la secuenciación parcial de la región ITS (con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4) y el gen de la β -tubulina (con los oligonucleótidos T1 y Bt2b) para confirmar su identificación. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso EU597296 y EU600926, respectivamente.

El análisis de las secuencias ITS de otros aislados permitió identificar cinco aislados como *Cadophora luteo-olivacea* (99% de identidad con las secuencias GU128589 y HQ661095). Esta especie ha sido descrita recientemente como patógena de vid (Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2011) capaz de causar lesiones en el xilema de plantas jóvenes.

A partir de las 415 muestras de vid analizadas se obtuvieron, además de los 1218 aislados identificados anteriormente, otras especies descritas como no asociadas a los decaimientos de la vid. Estos aislados fueron identificados por secuenciación de la región ITS con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4. Mediante el análisis BLASTN, se identificaron *Bionectria ochroleuca* (anamórfo *Glicocladium roseum*), *Nectria* sp., *Gibberella* sp., *Fusarium* sp., *Glomerella* sp., *Colletotrichum* sp., *Entoleuca* sp., *Acremonium* sp., *Psathyrella* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Coprinellus* sp., *Neofabraea* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Eppicoccum* sp., y *Phoma* sp.

1.3.3. Distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León

La Figura 1.3.10 muestra de forma resumida los porcentajes de las especies fúngicas asociadas a los decaimientos de la vid con mayor incidencia. Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *Di. seriata* (24,54%); *Pa. chlamydospora* (19,07%) y *Pm. aleophilum* (15,60%).

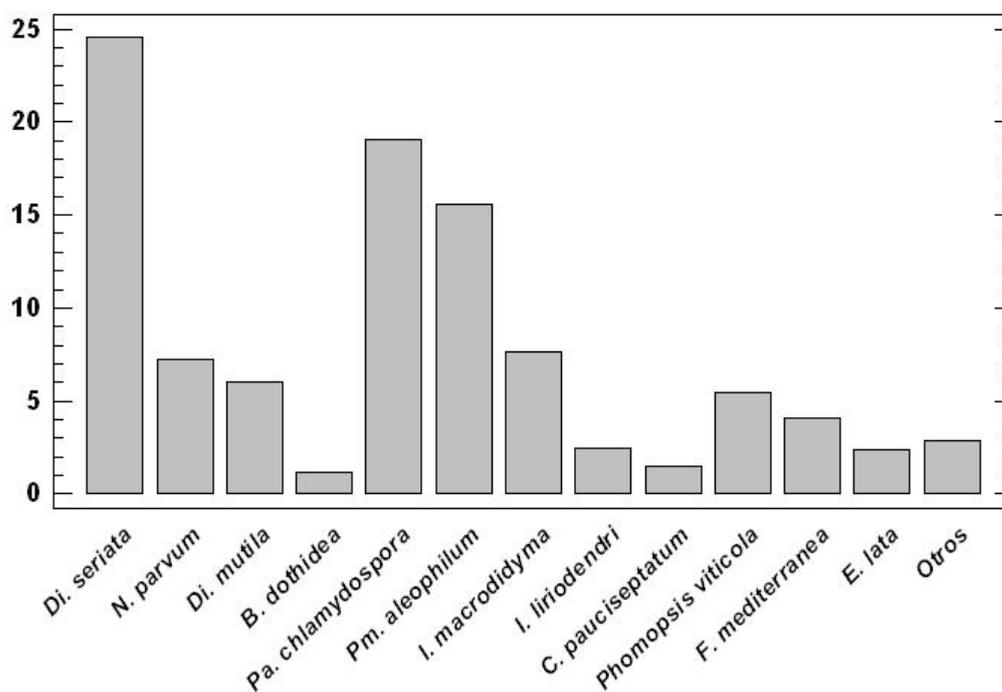


Figura 1.3.10. Porcentaje de las especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid identificadas en este trabajo. La columna denominada "otros" agrupa un total de 14 especies minoritarias con un número de aislados ≤ 5 : *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Dothiorella iberica*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola*, *N. australe*, *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. iranianum*, *Pm. hispanicum*, *Cylindrocarpon olidum*, *Stereum hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

1.3.3.1. Distribución según la edad de la planta

Atendiendo a la edad de las plantas analizadas, se ha encontrado una distribución desigual de los hongos asociados a los decaimientos de la vid. La Figura 1.3.11 muestra proporcionalmente la frecuencia de los hongos aislados a partir de plantas jóvenes y adultas. El número de aislados en cepas adultas (708) fue muy superior al de las plantas jóvenes (274).

En plantas jóvenes (≤ 5 años) los aislados con mayor frecuencia fueron *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* spp., *N. parvum*, *Pm. aleophilum* y *Pa.*

chlamydospora. Las especies minoritarias *L. theobromae*, *N. mediterraneum*, *Do. viticola*, *N. australe* y *Pm. hispanicum* (representadas en la categoría de otros) fueron aisladas únicamente en plantas jóvenes.

En plantas adultas (> 5 años) los aislados con mayor frecuencia fueron *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Las especies *E. lata* y *F. mediterranea* se encontraron solamente en plantas adultas. Otras especies minoritarias aisladas únicamente en planta adulta fueron: *Do. iberica*, *Pm. mertoniae*, *Pm. iranianum*, *Pm. viticola*, *S. hirsutum* y *Cryptovalsa ampelina* (otros en la Figura 1.3.11). Las especies *B. dothidea* y *Phomopsis viticola* fueron aisladas tanto en planta joven como en planta adulta, al igual que las especies minoritarias *Do. sarmentorum* y *Cadophora luteo-olivacea*.

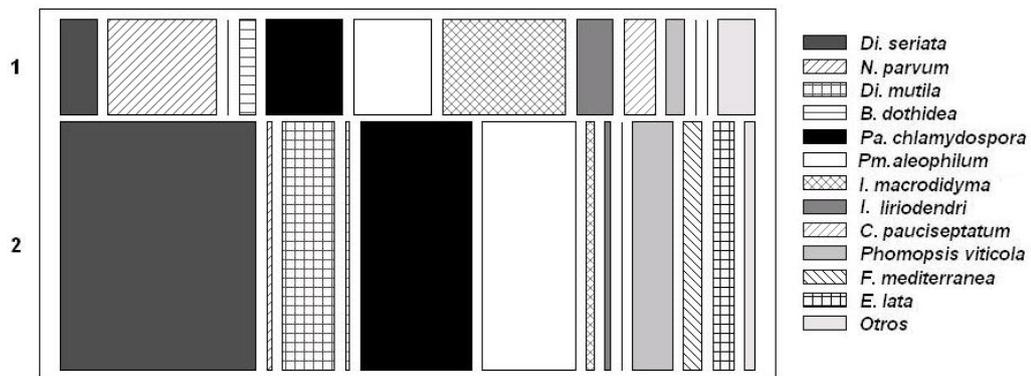


Figura 1.3.11. Frecuencia de las especies mayoritarias de los hongos aislados: (1) en planta joven y (2) en planta adulta. En la leyenda "Otros" agrupa un total de 14 especies minoritarias con un número de aislados ≤ 5 : *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Dothiorella iberica*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola*, *N. australe*, *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. mertoniae*, *Pm. iranianum*, *Pm. hispanicum*, *Cylindrocarpon olidum*, *Stereum hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

1.3.3.2. Distribución según la sintomatología de las cepas

La correlación entre los síntomas externos observados en campo y las lesiones internas observadas en la madera dificultó la clasificación de algunas plantas analizadas y su asignación a una de las categorías de enfermedades establecidas (Figura 1.3.12).

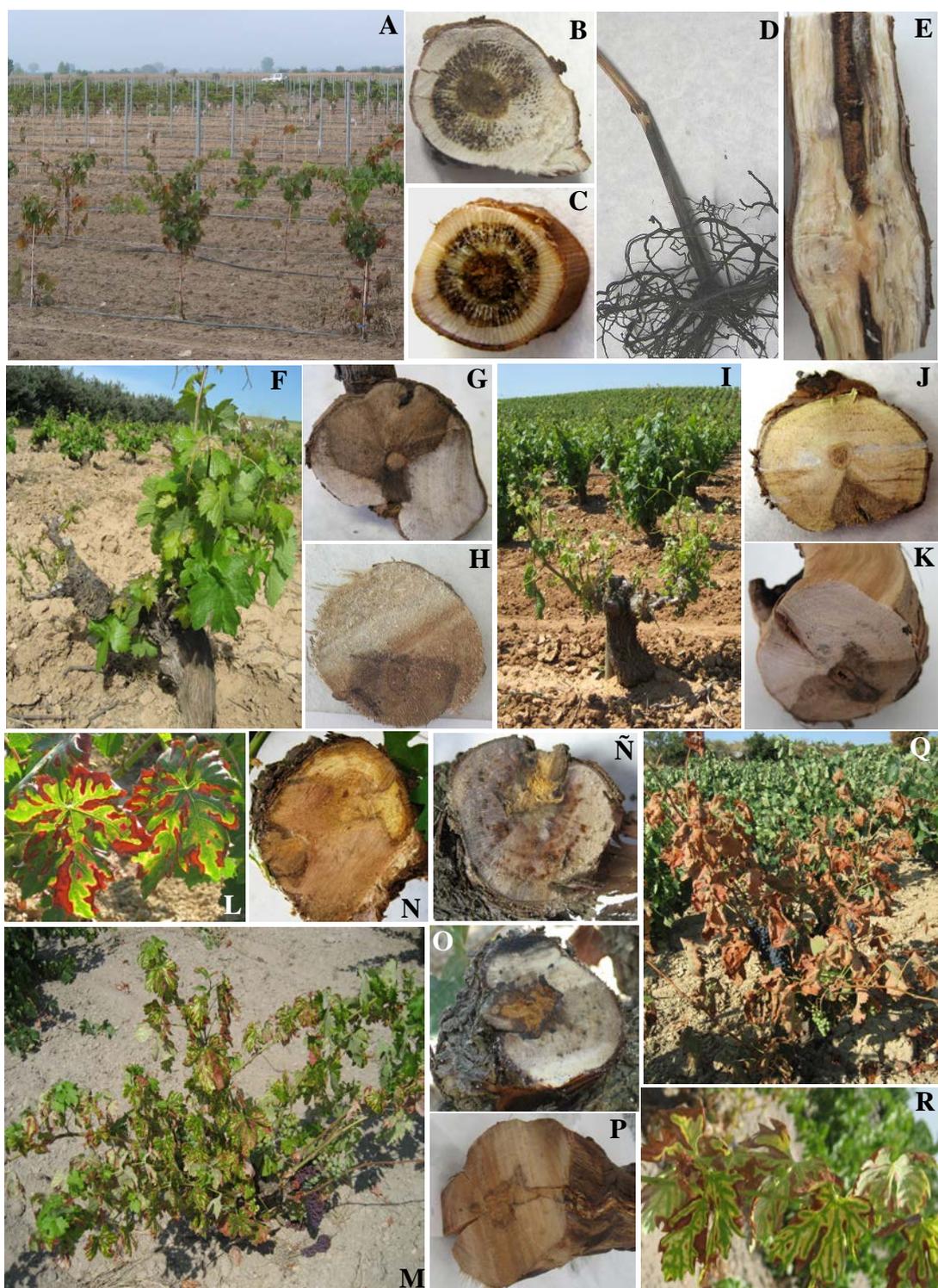


Figura 1.3.12. A-E: Sintomatología de plantas jóvenes con enfermedad de Petri o pie negro. A: Plantas jóvenes con escasa brotación. **B y C:** Cortes transversales del portainjerto que muestran los vasos necrosados alrededor de la médula. **D:** Coloración oscura observada en la base del portainjerto de una planta con enfermedad de pie negro. **E:** Corte transversal que muestra estrías oscuras paralelas a la médula. **F-K: Sintomatología de plantas con eutipiosis. F e I:** Síntomas foliares externos. **G, H, J y K:** Necrosis sectorial de color marrón oscuro en forma de V. **L-R: Sintomatología de plantas con yesca. L:** Síntomas foliares en variedad tinta. **M y R:** Síntomas foliares en variedad blanca. **Q:** Síntomas de apoplejía. **N-P:** Cortes transversales de madera con áreas necróticas y podredumbre amarillenta y esponjosa.

El número de aislados totales fue de 67 en plantas afectadas por la enfermedad de Petri o pie negro, 313 en plantas con sintomatología de eutipiosis, 239 en plantas afectadas por yesca, 129 en plantas con otros síntomas y 216 en las plantas que no presentaron síntomas. Se calculó la frecuencia de los hongos aislados para cada una de las sintomatologías de la vid (Figura 1.3.13).

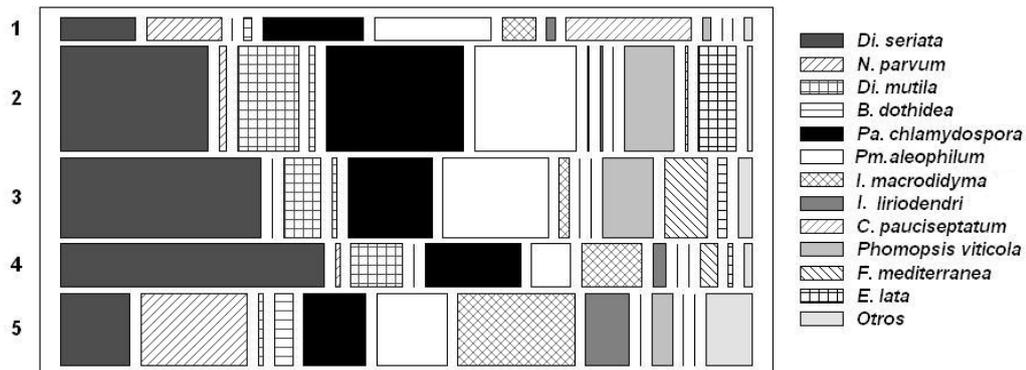


Figura 1.3.13. Frecuencia de las especies mayoritarias de hongos aislados: (1) en cepas jóvenes con síntomas de enfermedad de Petri o pie negro, (2) en plantas adultas con síntomas de eutipiosis, (3) en plantas adultas con síntomas de yesca, (4) en cepas con otros síntomas y (5) en plantas sin síntomas (en su mayoría jóvenes). En la leyenda “Otros” agrupa un total de 14 especies minoritarias con un número de aislados ≤ 5 : *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Dothiorella iberica*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola*, *N. australe*, *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. iranianum*, *Pm. hispanicum*, *Cylindrocarpon olidum*, *Stereum hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

Es importante resaltar que en todas las categorías establecidas el mayor porcentaje de aislados corresponde a los miembros de la familia Botryosphaeriaceae (*Di. seriata*, *N. parvum*, *Di. mutila* y *B. dothidea*). *Pa. chlamydospora* fue aislado en todas las categorías, siendo mayor su frecuencia entre las plantas afectadas por eutipiosis y enfermedad de Petri o pie negro. La especie *Pm. aleophilum* también fue encontrada en todas las categorías de sintomatología.

El aislamiento de especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* fue mínimo entre las plantas adultas afectadas por yesca y eutipiosis. Sin embargo, su frecuencia fue importante en las plantas jóvenes afectadas por la enfermedad de Petri o pie negro. El 87% de las plantas incluidas en la categoría “sin síntomas” se corresponde con plantas jóvenes. En esta categoría destaca también la presencia de las especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria*.

Entre las especies minoritarias, los aislados de *F. mediterranea* se detectaron principalmente en plantas afectadas por yesca, mientras los aislados de *E. lata* fueron mayoritariamente aislados en las plantas con síntomas de eutipiosis. *Phomopsis viticola* fue aislado con mayor frecuencia en las vides adultas con sintomatología de yesca y eutipiosis, aunque también fue aislado en planta joven con o sin síntomas.

En “otros” se agrupan especies aisladas esporádicamente. *Do. viticola* fue aislado en una planta joven con síntomas de enfermedad de Petri y *Do. iberica* en plantas con síntomas de eutipiosis. Entre las plantas afectadas por yesca se aislaron *Phaeoacremonium viticola*, *Pm. iranianum*, *S. hirsutum* y *Cryptovalsa ampelina*. *Lasiodiplodia theobromae*, *Do. sarmentorum*, *N. australe*, *N. mediterraneum*, *Pm. hispanicum* y *Cadophora luteo-olivacea* fueron aislados en plantas sin síntomas.

1.3.3.3. Distribución de los aislados en la planta de vid

Otra información relevante puede ser el lugar de la planta dónde se encuentran los hongos causantes de los decaimientos de la vid. Por ello se analizó la distribución de los aislados a lo largo de la planta estableciendo cinco zonas o niveles: 1) la raíz, 2) la zona de inserción de la raíz, 3) la madera del portainjerto, 4) la zona del injerto y 5) la madera de la variedad. El número total de aislados en cada zona fue de 30, 138, 132, 76 y 636, respectivamente. Los resultados de frecuencia según las especies fúngicas se muestran en la Figura 1.3.14.

Para los miembros de la familia Botryosphaeriaceae se encontró una mayor frecuencia de *Di. seriata* y *Di. mutila* en la madera de la variedad. Sin embargo, la mayor frecuencia de *N. parvum* fue obtenida en la zonas de inserción de la raíz, la madera del portainjerto y la zona del injerto. Las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* se aislaron en todas las zonas de la planta, aunque su frecuencia fue ligeramente superior en la madera del portainjerto y la zona del injerto. Las especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* fueron aisladas con mayor frecuencia en la zona de la raíz, su inserción y la zona del injerto, siendo mínimo su aislamiento en la madera de la variedad. Los aislados de *Phomopsis viticola* y *F. mediterranea* fueron

encontrados en casi todas las zonas de la planta, pero *E. lata* se aisló únicamente en madera de la variedad.

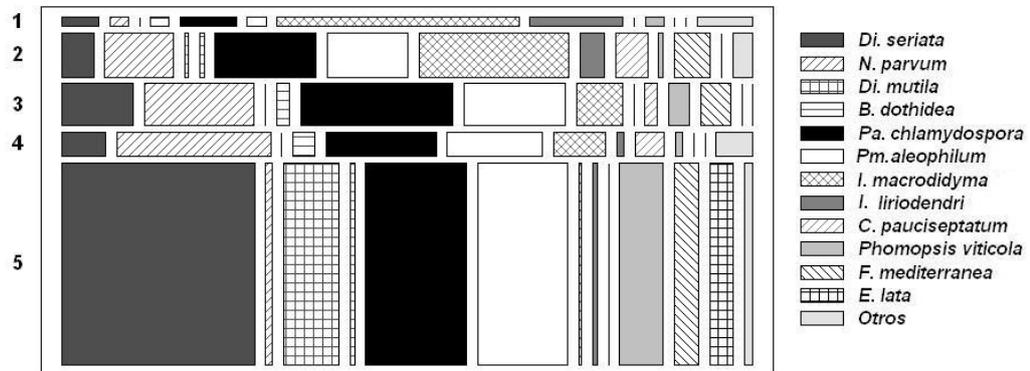


Figura 1.3.14. Frecuencia de las especies mayoritarias de los hongos aislados: (1) en la raíz, (2) en la inserción de la raíz, (3) en la madera del portainjerto, (4) en la zona del injerto y (5) en la madera de la variedad. En la leyenda “Otros” agrupa las especies minoritarias: *L. theobromae*, *N. mediterraneum*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola*, *N. australe*, *Do. iberica*; *P. hispanicum*, *Pm. mortoniae*, *Pm. iranianum*, *Pm. viticola*; *S. hirsutum*, *Cryptovalsa ampelina* y *Cadophora luteo-olivacea*.

Entre las especies aisladas con menor frecuencia (“otros”), *L. theobromae* fue aislada en la raíz y la zona de inserción de la raíz. *Do. sarmentorum* y *Phaeoacremonium viticola* fueron encontrados en la zona de inserción de la raíz. De la zona del injerto se aislaron *Do. iberica*, *Do. viticola*, *N. australe* y *Cadophora lutea-olivacea*, también aislado de la raíz y la madera de la variedad. *Stereum hirsutum* fue aislado de la madera de la variedad y de un carpófago externo.

1.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha presentado la incidencia de yesca y eutipiosis en seis DD.OO. de Castilla y León. El seguimiento de las prospecciones de campo en dos periodos resultó adecuado para el estudio de la sintomatología externa de eutipiosis y yesca, así como para la recogida de muestras. Los resultados obtenidos confirman la presencia de estas dos enfermedades en los viñedos de la comunidad, aunque su incidencia difiere según la zona y los años. De forma general en Castilla y León la incidencia de eutipiosis ha sido mayor que la incidencia de yesca durante el periodo estudiado.

Especialmente preocupantes son los grandes incrementos de eutipiosis observados en las DD.OO. Cigales y Toro durante 2008, o el aumento sorprendente de yesca en 2010 en la D.O. Toro. Numerosos estudios han mostrado que la sintomatología externa de yesca es variable a lo largo de los años en Italia (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2000; Romanazzi *et al.*, 2009), Francia (Perós *et al.*, 2008) y España (Redondo *et al.*, 2001). Sin embargo, para la sintomatología de eutipiosis existe controversia. Estudios realizados en la Rioja Alavesa indican que los síntomas foliares de eutipiosis son constantes a lo largo de varios años (Muruamendiaraz *et al.*, 2007). Mientras en Australia se han descrito discontinuidades anuales en la aparición de los síntomas (Sosnowski *et al.*, 2007).

Las variaciones interanuales estarían relacionadas con diferentes factores entre los que destaca la oscilación de las condiciones climatológicas (Surico *et al.*, 2004; Sosnowski *et al.*, 2007). Por ello, el seguimiento realizado durante varios años continuos (3-5 años) en un mismo viñedo es obligatorio para abordar esta problemática y ha sido demostrado previamente por otros autores que cuantificaron la incidencia acumulativa de yesca (Surico *et al.*, 2000; Redondo *et al.*, 2001; Romanazzi *et al.*, 2009).

La evolución de las dos sintomatologías parece no estar relacionada, ya que en los últimos años las DD.OO. con índices más elevados de eutipiosis fueron Cigales, Ribera de Duero y Tierra del vino de Zamora, mientras que el mayor índice de yesca se ha cuantificado en las DD.OO. de Toro y Tierra del vino de Zamora. La superposición de las dos sintomatologías ha sido puesta de

manifiesto recientemente en algunas zonas de Francia (Perós *et al.*, 2008) y puede explicar los datos observados en la D.O. Tierra del Vino de Zamora.

La identificación en base a características morfológicas ha sido muy útil para diferenciar los grandes grupos de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Pero no permite una discriminación definitiva entre especies del mismo género, por lo que recurrir a métodos moleculares para confirmar la identificación morfológica ha sido necesario.

En base al estudio de los patrones de restricción del amplímero ITS1-NL4, se han identificado las especies *Di. seriata*, *N. parvum*, *Di. mutila* y *B. dothidea*. Pero esta herramienta no ha sido suficiente para diferenciar las especies minoritarias de la familia Botryosphaeriaceae detectadas en Castilla y León. Para la clara discriminación de algunas especies además de la secuencia ITS se ha recurrido a las secuencias del gen de la β -tubulina (exones 3 a 6 con Bt2a-Bt2b) y el FE1- α . Otros autores ya han estudiado previamente estas regiones, demostrando su eficacia para resolver algunas de las ambigüedades generadas y ubicar taxonómicamente nuevas especies (van Niekerk *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

La amplificación y posterior secuenciación de la región ITS no permitió identificar todas las especies del género *Phaeoacremonium*, tal y como fue propuesto por Groenewald *et al.*, (2001) y Mostert *et al.*, (2005). En este último trabajo se introdujo el análisis de secuencias de la β -tubulina (exones 1 a 6) para reclasificar y describir nuevas especies de *Phaeoacremonium*. Desde entonces el gen de la β -tubulina ha sido empleado en numerosos trabajos para la identificación y caracterización de *Phaeoacremonium* spp. asociados a los decaimientos de la vid (Mostert *et al.*, 2006; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009a; Martín *et al.*, 2011).

Petit & Gubler, (2005), basándose en la amplificación parcial del gen de la β -tubulina (exones 6 y 7) describieron la existencia de una inserción de 52 pb característica de *C. liriodendri* y ausente en *C. macrodidymum*, especies responsables del pie negro en California. Esta herramienta fue utilizada con éxito en la caracterización de una población de 82 aislados del género *Cylindrocarpon* en España (Alaniz *et al.*, 2007). Sin embargo, los datos

presentados en este trabajo demuestran una debilidad de esta técnica porque no ha sido posible diferenciar *I. macrodidyma* de *C. pauciseptatum* (amplímero de ~520 pb), ni *I. lirioidendri* de *C. olidum* (amplímero de ~470 pb). Para resolver la identificación de las especies próximas se procedió a la amplificación y secuenciación de la región ITS. Alaniz *et al.* (2009), diseñaron en la región ITS tres pares de oligonucleótidos específicos para reconocer *I. macrodidyma*, *I. lirioidendri* y *C. pauciseptatum* en una reacción múltiple de PCR. Mientras estudios más recientes (Cabral *et al.*, 2012a y b) han demostrado que el análisis de regiones como la histona (H3) o el factor de elongación son de utilidad en la identificación de *Ilyonectria* spp. Por lo tanto, nuevas investigaciones serán necesarias para identificar, de forma más rápida y fiable, las especies del género actual: *Ilyonectria*, causantes del pie negro en Castilla y León.

En conjunto, la amplificación por PCR y el posterior análisis de los fragmentos de las regiones ITS, β -tubulina y FE1- α ha sido útil en la identificación de especies aisladas minoritariamente como *Do. iberica*, *Do. viticola* y *Do. sarmentorum* entre otras. Muchas de estas especies suponen nuevos registros en Castilla y León: *L. theobromae* y *Cryptovalsa ampelina* (Martín *et al.*, 2009); *N. mediterraneum* y *N. australe* (Martín *et al.*, 2011b); *Phaeoacremonium viticola* y *Pm. hispanicum*, (Martín *et al.*, 2011); *Pm. mortoniae*; *Cylindrocarpon olidum* (Cobos, 2008); *C. pauciseptatum* (Martín *et al.*, 2011a) y *Cadophora luteo-olivacea*.

Otras especies de hongos no asociadas a los decaimientos de la vid han sido aisladas e identificadas en Castilla y León. La presencia de hongos endofíticos en muestras de vid ha sido propuesta también por otros autores (Casieri *et al.*, 2009; González & Tello, 2011; Hofstetter *et al.*, 2012).

Si bien la utilización de oligonucleótidos universales permite estudiar la variabilidad inter-específica y establecer identificaciones al comparar las secuencias obtenidas con otras previamente depositadas en la base de datos GenBank; hay que resaltar que la mejor herramienta para identificar de forma rápida, inequívoca y menos costosa las diferentes especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid, son los oligonucleótidos específicos. En este sentido se han obtenido buenos resultados en la identificación de las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* (Tegli *et al.*, 2000), *F. mediterranea*

(Pollastro *et al.*, 2001) y *Cryptovalsa ampelina* (Luque *et al.*, 2006). En este trabajo, los oligonucleótidos específicos Lata1 y Lata2.2 (Lecomte *et al.*, 2000) no amplificaron todos los aislados estudiados. Problemas similares relacionados con la especificidad y amplificación de todos los aislados de una población de aislados de *E. lata* australianos fueron descritos por Lardner *et al.* (2005), quienes propusieron nuevos oligonucleótidos específicos para *E. lata* basándose en la técnica SCAR. En Castilla y León se hace necesario probar nuevos oligonucleótidos específicos para mejorar la identificación de esta especie.

Solamente con una correcta identificación de los hongos aislados se pueden establecer asociaciones entre las especies y la edad, la sintomatología o las zonas de la planta de vid. Las tres especies aisladas con mayor frecuencia en Castilla y León han sido *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. *Diplodia seriata* ha sido aislada con mayor frecuencia en plantas adultas con sintomatología de eutipiosis, yesca y otros síntomas a partir de madera de la variedad. La presencia de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* ha sido registrada con frecuencias similares en plantas jóvenes y adultas, en todas las sintomatologías y zonas de la planta estudiadas.

Estos resultados coinciden parcialmente con los publicados por Armengol *et al.*, (2001), quienes analizaron 140 plantas de distintas regiones vitivinícolas españolas. Y observaron una mayor presencia de las especies *Pa. chlamydospora* y *F. mediterranea* en plantas con síntomas de yesca; mientras en plantas con otros síntomas de decaimiento encontraron mayoritariamente *Di. seriata*, *Pm. aleophilum* y *Cylindrocarpon spp.*

En Castilla y León *F. mediterranea* fue aislado del 4,8% de las plantas analizadas sumando el 4% del total de los aislados. Este resultado se traduce en una baja frecuencia comparada con lo publicado en otras regiones españolas. En Valencia (Sánchez-Torres *et al.*, 2008), las especies asociadas a la yesca con más frecuencia fueron *Di. mutila*, *F. mediterranea* y *S. hirsutum*. En Madrid (González & Tello, 2011) también se ha encontrado *F. mediterranea* con mayor frecuencia (7%) que en Castilla y León. Por su parte, *S. hirsutum* fue aislado de forma simbólica en Castilla y León. La baja proporción de aislamiento de *S. hirsutum* coincide con los resultados de Armengol *et al.*,

(2001) y González y Tello (2011) en España y otros autores en Italia (Mugnai *et al.*, 1999) y Francia (Larignon & Dubos, 1997), que indican que la presencia de este hongo en vides con yesca es muy inferior a la de *Fomitiporia* spp.

En el estudio de las plantas con sintomatología de eutipiosis, los resultados obtenidos en Castilla y León concuerdan parcialmente con los encontrados en La Rioja, dónde los aislamientos de *Di. seriata* fueron más frecuentes que los de *E. lata* al comparar plantas con sintomatología típica de eutipiosis y sin síntomas. Aunque *E. lata* fue más frecuente en las plantas que mostraron sintomatología externa de eutipiosis (Murua Mendiaraz & Legorburu, 2009). En Castilla y León se ha observado una elevada frecuencia de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* en plantas con sintomatología de eutipiosis que no ha sido contrastada en otras regiones de España. Aunque recientemente en Argelia se ha asociado *Phaeoacremonium* spp. con eutipiosis (Berraf-Tebbal, *et al.* 2011).

Los síntomas externos de eutipiosis fueron claramente visibles y distinguibles en las prospecciones de campo, sin embargo a nivel interno, la necrosis sectorial en forma de V, uno de los síntomas descritos para la eutipiosis, que también es compartido por el BDA, fue difícil de observar. A menudo se encontraron en madera punteaduras o necrosis con distribución irregular que junto con la ausencia de la madera blanda y esponjosa característica de la yesca obligaron a crear una nueva categoría en los síntomas observados (“otros síntomas”). En este grupo de plantas hay que resaltar la elevada frecuencia de las especies de la familia Botryosphaeriaceae y de *Cylindrocarpon* spp.

El BDA se asocia al aislamiento de Botryosphaeriaceae spp. (van Niekerk *et al.*, 2004; Lecomte *et al.*, 2005; Surico *et al.*, 2006; Martos, 2008). Pero existe controversia en la descripción de la sintomatología externa del BDA. Según Larignon *et al.*, (2001) las plantas con BDA tienen síntomas foliares similares a la yesca (pero que aparecen a finales de mayo) y un descortezado típico que muestra vetas longitudinales de madera oscura. Sin embargo, Lecomte *et al.*, (2005) encontraron dificultades para diferenciar ambas sintomatologías. Otros autores han expresado que los síntomas externos del BDA son similares a los observados en plantas afectadas por eutipiosis

(Luque *et al.*, 2009). Este hecho puede explicar en parte la abundancia de *Di. seriata* y la menor presencia de *E. lata* en plantas con sintomatología de eutipiosis en Castilla y León.

La presencia de una elevada frecuencia de aislados de *Cylindrocarpon* spp. en la categoría de “otros síntomas” (raramente encontrada en plantas con yesca o eutipiosis), nos lleva a asociar otros síntomas observados no con el BDA de forma específica; sino con un decaimiento diferente de la yesca, como ya apuntaron otros autores (Armengol *et al.*, 2001). *Phaeomoniella chlamydospora* y *Pm. aleophilum* también fueron aislados de plantas con “otros síntomas” apuntando que puede tratarse de plantas infectadas por los hongos pioneros de la yesca, pero que la enfermedad se encuentra en una fase de desarrollo, denominada yesca joven por algunos autores (Surico *et al.*, 2006).

En plantas jóvenes con sintomatología de enfermedad de Petri o pie negro y las plantas asintomáticas estudiadas en Castilla y León destaca una importante frecuencia de especies como *N. parvum*, *Cylindrocarpon* spp. y otras especies aisladas esporádicamente (además de *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*). Estos resultados están directamente relacionados con la distribución observada en plantas jóvenes y adultas, porque la mayoría de las plantas asintomáticas analizadas fueron menores de cinco años. Estudios recientes desarrollados para establecer la presencia de hongos asociados a los decaimientos de la vid en plantas madres y viveros en España han mostrado resultados similares (Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2006). El aislamiento de hongos a partir de material vegetal sin síntomas ha sido puesto de manifiesto en varios estudios y constituye un riesgo en los procesos de multiplicación de la vid (Fourie & Halleen 2004; Aroca *et al.*, 2010).

En 2009, Gramaje *et al.*, analizaron 62 muestras de vid de la variedad Syrah menores de 7 años encontrando *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum*, *C. luteo-olivacea*, *C. macrodidymum*, *Di. seriata* y *N. parvum* como especies más frecuentemente asociadas al decaimiento de la vid. La patogenicidad de *C. luteo-olivacea* y su relación con los decaimientos de la vid ha sido recientemente demostrada (Halleen *et al.*, 2007). A la luz de los resultados

obtenidos por Gramaje *et al.*, (2009b) y los presentados en este trabajo, debe considerarse la identificación y caracterización de esta especie en futuras investigaciones sobre los decaimientos de la vid en España.

En relación con las zonas de la planta analizadas, Gramaje *et al.*, (2009b) observaron que los hongos asociados al decaimiento del cv. Syrah se aislaron mayoritariamente del portainjerto y la zona del injerto, encontrándose en la variedad solamente *Pa. chlamydospora* y Botryosphaeriaceae. Los resultados obtenidos en Castilla y León concuerdan en parte con los expuestos por Gramaje *et al.* (2009b), aunque demuestran que la frecuencia de aislamiento de los hongos asociados a los decaimientos de la vid es mayor en la zona de la variedad que en las otras zonas estudiadas. Este hecho puede deberse al análisis de plantas adultas de mucha edad, que no fue abordado por los autores anteriormente citados. En Castilla y León *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* se aislaron en todas las partes de la planta, con una frecuencia algo mayor en el portainjerto y la zona del injerto. *Phaeoacremonium aleophilum* y *Pa. chlamydospora* han sido aislados con frecuencia en la madera del portainjerto en España (Aroca *et al.*, 2006) y en otras zonas vitivinícolas (Ridgway *et al.*, 2002; Zanzotto *et al.*, 2007).

La distribución de las especies de la familia Botryosphaeriaceae en Castilla y León muestra una relación con la zona de la planta analizada. *Di. seriata* y *Di. mutila* se aislaron fundamentalmente de la madera de la variedad coincidiendo con los resultados de Sánchez-Torres *et al.*, (2008), que indican una frecuencia significativamente mayor de *Di. mutila* en madera de la variedad. Por el contrario, las especies *N. parvum* y *B. dothidea* fueron más frecuentes en el portainjerto y la zona del injerto. La presencia de éstas especies de Botryosphaeriaceae en patrones injertados fue analizada por Aroca *et al.*, (2006) describiendo la presencia de *Di. seriata*, *N. parvum* y *B. dothidea* tanto en el portainjerto como en la zona del injerto.

En Castilla y León la frecuencia de *Cylindrocarpon* spp. fue mayor en las zonas de la raíz y la inserción de la raíz, en menor proporción fue aislado del portainjerto y la zona del injerto; y rara vez fue aislado en madera de la variedad. Estos resultados confirman la relación entre *Cylindrocarpon* y la

enfermedad de pie negro (Halleen *et al.*, 2004 y 2006) y coinciden con los encontrados por Alaniz *et al.*, (2007 y 2009) en España.

A través de las prospecciones de campo realizadas en Castilla y León se ha constatado la existencia de dos patologías diferentes: yesca y eutipiosis, y la variabilidad interanual en la aparición de los síntomas foliares. El número de especies asociadas con los decaimientos de la vid se ha incrementado durante los últimos años y requiere de técnicas de biología molecular para su identificación. En Castilla y León no se han observado diferencias importantes en la distribución de las especies fúngicas en función de la sintomatología analizada, lo que sugiere que a menudo diferentes enfermedades de los decaimientos de la vid pueden ocurrir de forma conjunta sobre una misma planta, o bien que el problema de los decaimientos de la vid debe ser abordado como un todo sin diferenciar las distintas patologías. Asociar uno o varios patógenos como causantes de una única enfermedad o sintomatología sigue siendo controvertido en la actualidad y reducir la presencia de determinadas especies a una enfermedad es una tarea compleja y a menudo errónea.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 91: 1187-1193.
- Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., & León, M. (2009). A Multiplex PCR System for the Specific Detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from Grapevine. *Plant Disease*, 93: 821-825.
- Alves, A., Phillips, A.J., Henriques, I. & Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 221-229.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. & García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 325-329.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.
- Aroca, A. & Raposo, R. (2007). PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2911-2918.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 165-174.
- Berraf-Tebbal, A., Bouznad, Z., Santos, J.M., Coelho, M. A., Péros, J.P. & Phillips, A. J. L. (2011). *Phaeoacremonium* species associated with Eutypa dieback and esca of grapevines in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement): S86-S97.
- Burgess, T., Barber, P.A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer, W. & Wingfield, M.J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*, 98: 423-435.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2012a). Multi-gene analysis and morphology reveal novel

- Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, 116: 62-80.
- Cabral, A., Groenewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. & Crous, P.W. (2012b). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress*, 11: 655-688.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O. & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 73-83.
- Cobos, R. (2008). Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Cobos, R. & Martín, M.T. (2008). Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines of Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.
- Di Marco, S., Mazullo, A., Calzarano, F. & Cesari, A. (2000). The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 232-240.
- Dubos, B. (2002). *Maladies cryptogamiques de la vigne*. Ed. Feret. Bordeaux.
- Dubrovsky, S. & Fabritius, A.L. (2007). Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 84-86.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P.W., Gronewald, J.Z. & Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*, 21:119-134.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33: 313-315.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2006). Occurrence of Fungal Pathogens Associated with Grapevine Nurseries and Decline of Young Vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154: 598-602.
- Glass, N.L. & Donaldson, G.C. (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330.
- González, V. & Tello, M.L. (2011). Enfermedades emergentes de la madera de vid de la zona centro de España. *Interempresas.net*: <http://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/51545->

Enfermedades-emergentes-de-la-madera-de-vid-de-la-zona-centro-de-Espana.html

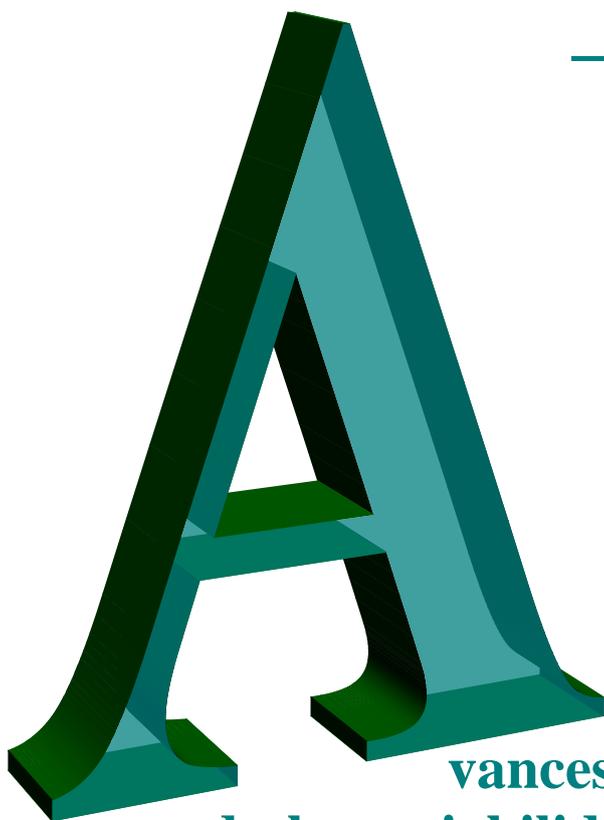
- Gramaje, D., Armengol, J., Mohammadi, H., Banihashemi, Z. & Mostert, L. (2009a) Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia*, 101: 920-929.
- Gramaje, D., Muñoz, M.R., Lerma, M.L., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2009b). Fungal grapevine trunk pathogens associated with Syrah decline in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 396-402.
- Gramaje, D., Mostert, L. & Armengol, J. (2011). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement): S112-S126.
- Groenewald, M., Bellstedt, D.U. & Crous, P.W. (2000). A PCR-based method for the detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevines. *South African Journal of Science*, 96: 43-46.
- Groenewald, M., Kang, J.C., Crous, P.W. & Gams, W. (2001). ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Mycological Research*, 105: 651-657.
- Halleen, F., Schroers, H.J., Gronewald, J.Z. & Crous, P.W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot diseases of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, 50: 431-455.
- Halleen, F., Schroers, H.J., Gronewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. & Crous, P.W. (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology*, 55: 227-234.
- Halleen, F., Mostert, L. & Crous, P.W. (2007). Pathogenicity testing of lesser-known, vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 36: 277-285.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A. & Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*, 54: 51-67.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Lardner, R., Stummer, B.E., Sosnowski, M.R. & Scott, E.S. (2005). Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*, 109: 799-808.
- Larignon, P. & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 147-157.

- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. & Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 336-342.
- Lecomte, P., Péros, J.P., Blancard, D., Bastien, N. & Délye, C. (2000). PCR assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4.475-4.480.
- Lecomte, P., Leyo, M., Louvet, G., Corio-Costet, M.F., Guadillère, J.P. & Blancard, D. (2005). Le Black Dead Arm, genèse des symptômes. *Phytoma – La défense des végétaux*, 587: 29-37.
- Luque, J., Martos, S. & Phillips, A.J.L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, 97: 1111-1121.
- Luque, J., Sierra, D., Torres, E. & García, F. (2006). *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: Identification and pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S101-S109.
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R. & Garcia-Fihueros, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology*, 91: 381-390.
- Martín, L., Cuesta, M.J. & Martín, T. (2011). A new report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. hispanicum* causing grapevine trunk disease in Castilla y León, Spain. *New Disease Reports*, 23: 27.
- Martin, M.T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.
- Martin M.T., Martín, L., de-Francisco, M.T. & Cobos, R. (2009). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Cryptovalsa ampelina* Associated with Grapevine Decline from Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 93: 545
- Martin, M.T., Martín, L., Cuesta M.J. & García-Benavides, P. (2011a). First Report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* Associated with Grapevine Decline from Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 95: 361
- Martin, M.T., Martín, L. & Cuesta M.J. (2011b). First Report of *Neofusicoccum mediterraneum* and *N. australe* Causing Decay in *Vitis vinifera* in Castilla y León, Spain. *Plant Disease*, 95: 876.
- Martos, S. (2008). El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. & Summerbell, R.C. (2003). *Togninia* (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of

- Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Robert, V., Sutton, D.A., Padhye, A.A., & Crous P.W. (2005) Species of *Phaeoacremonium* associated with human infections and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1752-1767.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W. & Crous P.W. (2006). Taxonomy and Pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54: 1-115.
- Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83: 404-418.
- Muruamendiaraz, A., Iturriza, E. & Legorburu, F.J. (2007). Foliar symptoms of eutypa dieback are consistent over years and vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 122-123.
- Muruamendiaraz, A. & Legorburu, F.J. (2009). Suitability of an increment borer as a sampling device for grapevine trunk disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 145-149.
- O'Donnell, K. (1993) Fusarium and its near relatives. En: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225-233. Reynolds, D.R. & Taylor, J.W., Eds. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 7:103-116.
- Pascoe, I. & Cottral, E. (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 68-75.
- Péros, J.P., Berger, G. & Jamaux-Despréaux, I. (2008). Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology*, 156: 297-303.
- Petit, E. & Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89: 1051-1059.
- Phillips, A.J., Alves, A., Correia, A. & Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97: 513-529.
- Phillips, A.J., Crous, P.W. & Alves, A. (2007). *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusata*. *Fungal Diversity*, 25: 141-155.

- Phillips, A.J.L., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A. & Crous, P.W. (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomy status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia*, 21: 29-55.
- Pollastro, S., Dongiovanni, C., Abbatecola, A., De Guido, M.A., Miccolis, R.M. & Faretra, F. (2001). Specific SCAR primers for fungi associated with wood decay of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S362-S368.
- Redondo, C., Tello, M.L., Ávila, A. & Mateo-Sagasta, E. (2001). Spatial distribution of symptomatic grapevines with esca disease in the Madrid region (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S439-S442.
- Ridgway, H.J., Sleight, B.E. & Stewart, A. (2002). Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31: 267-271.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Pizzichini, L. & Nardi, S. (2009). Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 277-290
- Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V. & Tuset, J.J. (2008). Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 650-660.
- Schroers, H.J., Žerjab, M, Munda, A, & Halleen, F. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research*, 112: 82-92.
- Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Couthino, T.A., Wingfield, B.D. & Wingfield, M.J. (2004). Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96:83-101.
- Sosnowski, S.R., Shtienberg, D., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R., & Scott, S. (2007). The Influence of Climate on Foliar Symptoms of *Eutypa Dieback* in Grapevines. *Phytopathology - Ecology and Epidemiology*, 97: 1284-1289.
- Surico, G., Marchi, G., Ferrandino, F.J., Braccini, P. & Mugnai, L. (2000). Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 211-224.
- Surico, G., Bandinelli, R., Braccini, P., Di Marco, S., Marchi, G., Mugnai, L. & Parrini, C. (2004). On the factors that may have influenced the esca

- epidemic in Tuscany in the Eighties. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 136-143.
- Surico, G., Mugnai, L. & Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S68-S86.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Tegli, S., Bertelli, E. & Surico, G. (2000). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 134-149.
- Tello, M.L., Gaforio, L. & Pastor, S. (2009). Semi-selective media for the isolation of *Phaeoniella chlamydospora* from soil and vine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 11-19.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M. & Gubler, W.D. (2006). Identification and distribution of *Bothryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90: 1490-1503.
- van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Gronewald, J.C., Fourie, P.H. & Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96: 781-798.
- White, T.J., Bruns, T., Innis, M.A., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp 315-322.
- Zanzotto, A., Autiero, F., Belloto, D., Dal Cortivo, G., Lucchetta, G. & Borgo, M. (2007). Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoniella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 183-192.



vances moleculares en el estudio de la variabilidad genética y la detección de las tres especies mayoritarias

2.1. ANTECEDENTES

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

- 2.2.1. Caracterización molecular mediante AFLP
- 2.2.2. Detección de *Di. seriata* mediante la técnica SCAR
- 2.2.3. Detección de *Pm. aleophilum* mediante PCR a tiempo real

2.3. RESULTADOS

- 2.3.1. Caracterización molecular mediante AFLP
- 2.3.2. Detección de *Di. seriata* mediante la técnica SCAR
- 2.3.3. Detección de *Pm. aleophilum* mediante PCR a tiempo real

2.4. DISCUSIÓN

2.5. BIBLIOGRAFÍA

2.-AVANCES MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y LA DETECCIÓN DE LAS TRES ESPECIES MAYORITARIAS

2.1. ANTECEDENTES

Numerosas investigaciones han proporcionado avances en la detección e identificación de las distintas especies asociadas a los decaimientos de la vid. Pero los métodos convencionales continúan siendo tediosos y complejos, porque se requiere del reconocimiento de los síntomas en la vid, el aislamiento de los hongos, su examen morfológico y la extracción de ADN en el laboratorio, como fases previas. En Castilla y León se ha constatado la importancia de las especies *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* (Martín & Cobos, 2007). Sin embargo, su identificación por métodos clásicos puede tardar meses, por lo que se hace necesario continuar trabajando para establecer nuevos protocolos que permitan un diagnóstico más rápido y específico de estas especies.

Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos al abordar los decaimientos de la vid es la concurrencia de más de una especie fitopatógena en la misma planta. En el caso de la enfermedad de Petri están involucradas *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Sin olvidar que la presencia de éstos hongos en plantas asintomáticas ha sido demostrada en el presente trabajo (Capítulo 1) y también por otros autores (Fourie & Halleen, 2004; Aroca *et al.*, 2010). Por ello, la detección de los hongos fitopatógenos antes de que se desarrolle y manifieste la enfermedad puede contribuir a un manejo más eficiente de estas enfermedades. A través de una correcta identificación se puede actuar de modo preventivo, especialmente en las plantaciones jóvenes y en los viveros.

Los marcadores moleculares permiten el estudio de la variabilidad genética de las especies fitopatógenas y pueden ser útiles para investigar numerosos aspectos relacionados con los decaimientos de la vid tales como la etiología, la epidemiología, la taxonomía, o la mejora de los métodos de detección. Algunas de las técnicas utilizadas para la obtención de marcadores

moleculares son: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) o RAMS (*Random Amplified Microsatellites*), UP-PCR (*Universally Primed PCR*), rep-PCR (*Repetitive sequence-based PCR*) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). El polimorfismo genético resultante de la aplicación de estas metodologías permite establecer marcadores moleculares para la identificación de especies, realizar mapeo genómico y estudios de genética de poblaciones (McDonald, 1997). Su sensibilidad es tan alta que permiten incluso diferenciar individuos de una misma especie.

Estas técnicas han demostrado ser una herramienta poderosa para el análisis de la estructura de poblaciones y la variabilidad genética en hongos asociados a los decaimientos de la vid (Tegli *et al.*, 2000b; Péros *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2002; Péros & Berger, 2003; Alves *et al.*, 2004; Mostert *et al.*, 2006b; Cobos & Martín, 2008; Smetham *et al.*, 2008; Alaniz *et al.*, 2009; Tello *et al.*, 2010; Comont *et al.*, 2010).

Los marcadores RAPD y AFLP son de naturaleza dominante y a diferencia de otras técnicas no requieren ningún conocimiento previo sobre el genoma estudiado. Ambas metodologías abordan el genoma completo proporcionando un polimorfismo elevado y un número ilimitado de marcadores. Primero se describió la técnica RAPD (Williams *et al.*, 1990) en la que se emplea un oligonucleótido corto (10 pb) que se une de forma aleatoria a muchas regiones del genoma amplificando fragmentos de ADN al azar. La técnica de AFLP es más compleja porque se amplifican grupos de fragmentos que han sido previamente obtenidos por digestión del ADN genómico con endonucleasas y fue descrita con posterioridad (Vos *et al.*, 1995).

Pottinger *et al.* (2002), estudiaron la variabilidad genética en 39 aislados de *Pa. chlamydospora*, mediante RAPD, UP-PCR y AFLP. De las diferentes técnicas usadas, los AFLPs ofrecieron la máxima variabilidad y aportaron una mayor claridad para interpretar la distribución genotípica de los aislados de *Pa. chlamydospora*.

La técnica de AFLP ha sido poco utilizada para el estudio de la variabilidad genética de *Pa. chlamydospora* (Mostert *et al.*, 2006b; Comont *et al.*, 2010) y nunca aplicada a una población de aislados españoles. Hasta la fecha no se conocen resultados sobre la variabilidad genética de *Di. seriata* y

Pm. aleophilum utilizando AFLP. Además, la obtención de un patrón de fragmentos amplificados específico para cada especie puede ser de gran interés. Entre sus posibles aplicaciones destacaría la detección simultánea de diferentes especies en una misma muestra de ADN.

La metodología RAPD se caracteriza por su simplicidad, rapidez, y bajo coste. Además, mediante RAPD se puede obtener al azar una secuencia de ADN genómico especie-específico que sirve como diana para el diseño de oligonucleótidos específicos, conocidos como “SCAR primers” (*Sequence Characterised Amplified Regions*). Esta técnica ha sido aplicada con éxito en la detección de *Pa. chlamydospora*, *F. mediterranea*, *Phomopsis viticola* (Pollastro *et al.*, 2001) o *E. lata* (Lardner *et al.*, 2005) mediante el diseño de oligonucleótidos SCAR. Para las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* ya existen unos oligonucleótidos específicos (Tegli *et al.*, 2000a) que han dado buenos resultados en la amplificación mediante PCR convencional y PCR-múltiple (Cobos, 2008). Sin embargo, para *Di. seriata* todavía no existe esta herramienta, y para su identificación se recurre a la secuenciación o al análisis de restricción con endonucleasas.

Para mejorar un sistema de detección se buscan métodos más rápidos, y más sensibles, con elevada reproducibilidad y un bajo riesgo de contaminación. Lo deseado es mejorar la eficiencia, el límite de detección y la fiabilidad. Estas y otras ventajas como la posibilidad de automatización a gran escala han sido descritas para la metodología de *Real-Time PCR* (Schmittgen, 2001). La PCR a tiempo real permite monitorizar la amplificación de un fragmento de ADN molde a lo largo del tiempo mediante detección de fluorescencia en un tubo cerrado.

Overton *et al.* (2004) diseñaron un par de oligonucleótidos específicos para el género *Phaeoacremonium* que amplificaban un fragmento de la región ITS utilizando PCR a tiempo real con la tecnología SYBR[®] Green. Sin embargo, se ha demostrado que la región ITS no siempre permite la diferenciación entre especies del género (Groenewald *et al.*, 2001; Mostert *et al.*, 2003), por ello el diseño de oligonucleótidos especie-específicos en esta región del genoma no es posible. Mostert *et al.*, (2006a) han propuesto otras

regiones en los genes de la β -tubulina y la actina para mejorar la identificación de las especies de *Phaeoacremonium*.

Los fluoróforos inespecíficos como el SYBR[®] Green I son capaces de excitarse y se unen al ADN emitiendo una fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en la muestra (Wittwer *et al.*, 1997). Otros sistemas incorporan una sonda específica homóloga a una secuencia del amplímero obtenido con los oligonucleótidos de ambos extremos (sentido y antisentido) aumentando la especificidad de la reacción. Entre estas sondas destacan las sondas de hidrólisis TaqMan[®] desarrolladas por Applied Biosystems.

Una primera aproximación de la tecnología TaqMan[®] a la detección de especies del género *Phaeoacremonium* fue publicada por Aroca *et al.* (2008). En ese trabajo se utilizó el gen de la β -tubulina para diseñar un par de oligonucleótidos degenerados capaz de reconocer hasta nueve especies del género. Los oligonucleótidos degenerados fueron combinados con cuatro sondas TaqMan[®] especie-específicas para detectar *Pm. aleophilum*, *Pm. mortoniae*, *Pm. viticola* y *Pm. parasiticum*. Una de las principales aportaciones del sistema propuesto por estos autores fue la combinación de dos sondas especie-específicas en una misma reacción de PCR a tiempo real. La especificidad del sistema publicado por Aroca *et al.* (2008) fue probada utilizando ocho especies fúngicas: *Pa. chlamydospora*, *Acremonium alternatum*, *Di. seriata*, *N. parvum*, *Phomopsis quercella*, *Cylindrocarpon* spp., *Phialophora mustea* y *Fomitiporia punctata*. La sensibilidad fue estudiada únicamente para la detección de *Pm. parasiticum*.

De forma continuada, el sector demanda avances en la detección e identificación de los hongos implicados en los decaimientos de la vid. Debido a la importancia de técnicas de detección múltiple que reduzcan considerablemente el tiempo y la complejidad de las técnicas analíticas, se plantean en este Capítulo los siguientes objetivos:

- 1) Ensayar la utilidad de la técnica AFLP para diferenciar las especies: *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*; y estudiar la variabilidad genética entre las especies y dentro de cada especie.
- 2) Desarrollar un sistema de PCR convencional para identificar *Di. seriata*, mediante el reconocimiento de marcadores RAPD y el diseño de oligonucleótidos SCAR.
- 3) Establecer un protocolo eficiente de PCR a tiempo real para la detección de *Pm. aleophilum* sin realizar aislamiento ni extracción de ADN.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Caracterización molecular mediante AFLP

2.2.1.1. Aislados utilizados

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron un total de 52 aislados fúngicos (17 *Di. seriata*, 18 *Pa. chlamydospora* y 17 *Pm. aleophilum*) que fueron obtenidos de plantas de vid con síntomas de decaimiento o asintomáticas.

La mayoría de los aislados procedían de Castilla y León, aunque también fueron incluidos aislados de otras regiones españolas. Se utilizaron tres aislados de referencia de *Di. seriata*, uno de *Pa. chlamydospora* y uno de *Pm. aleophilum* procedentes de la colección del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda) o de California, para compararlos con los españoles.

La descripción detallada de los aislados aparece en las Tablas 2.2.1, 2.2.2 y 2.2.3.

Tabla 2.2.1. Aislados de *Di. seriata* utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP.

¹: Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. TP: Tempranillo, VD: Verdejo, SY: Syrah.

Aislado	Origen	Varietalidad	Edad	Zona de aislamiento	Síntomas
CBS719.85 ¹	Nueva Zelanda	nd	nd	nd	nd
Napa-c	California, USA	nd	nd	nd	nd
CBS112555 ¹	Portugal	nd	nd	nd	nd
Y46-1-1a	Cigales ²	nd/TP	80	variedad	yesca
Y62-1-1c	Arribes ²	nd	> 5	variedad	eutipiosis
Y79-4-3a	Ribera del Duero ²	nd/TP	10	variedad	eutipiosis
Y84-1-1a	Toro ²	nd/TP	> 5	variedad	eutipiosis
Y90-10-1a	Navarra	R110/VD	1	portainjerto	sin síntomas
Y103-3-3b	Extremadura	nd/TP	1	inserción raíz	Petri o pie negro
Y112-24-1a	Arribes ²	nd	> 5	variedad	eutipiosis
Y128-3-1b	Galicia	nd	> 5	variedad	sin síntomas
Y168-21-1b	Alicante	nd	> 5	variedad	yesca
Y178-11-1a	La Rioja	nd	> 5	variedad	sin síntomas
Y181-13-1b	Tierra de León ²	nd	> 5	variedad	eutipiosis
Y213-8-2c	Córdoba	R140/SY	> 5	portainjerto	yesca
Y221-14-3a	Rueda ²	nd/VI	20	variedad	eutipiosis
V14-2a	Vivero, España	R110/TP	1	zona de injerto	sin síntomas

Tabla 2.2.2. Aislados de *Pa. chlamydospora* utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP.

¹: Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³: Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid). TP: Tempranillo, VD: Verdejo, JG: Juan García.

Aislado	Origen	Varietalidad	Edad	Zona de aislamiento	Síntomas
CBS161.90 ¹	Sudáfrica	nd	nd	nd	nd
INIA_56b ³	Madrid	nd	nd	nd	nd
V13-1c	Vivero, España	R110/TP	1	portainjerto	sin síntomas
Y38-8-1c	Valles de Benavente ²	nd	> 20	nd	nd
Y80-10-2b	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y82-11-4b	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y82-15-1b	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y87-5-3c	Arribes ²	nd/JG	> 80	variedad	eutipiosis
Y87-7-1c	Arribes ²	nd/JG	> 80	variedad	eutipiosis
Y87-9-1b	Arribes ²	nd/JG	> 80	variedad	eutipiosis
Y89-7-1b	Rueda ²	nd/VD	< 5	inserción de raíz	Petri o pie negro
Y106-3-3c	Extremadura	nd/TP	1	inserción de raíz	Petri o pie negro
Y106-4-3b	Extremadura	nd/TP	1	inserción de raíz	Petri o pie negro
Y112-42-3c	Arribes ²	nd	> 5	variedad	eutipiosis
Y119-8-5b	Arribes ²	nd	> 5	variedad	eutipiosis
Y121-27-L1b	Arribes ²	nd	> 80	variedad	eutipiosis
Y121-29-6c	Arribes ²	nd	> 80	variedad	eutipiosis
Y122-14-3c	Arribes ²	nd	> 50	variedad	eutipiosis

Tabla 2.2.3. Aislados de *Pm. aleophilum* utilizados en la caracterización molecular mediante AFLP. ¹: Aislado CBS631.94 procedente de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³: Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid). ⁴: Aislado cedido por el Dr. P. García Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Aldearrubia (Salamanca). ⁵: Aislado cedido por el Dr. J. García Jiménez, Universidad Politécnica de Valencia (Valencia). ⁶: Aislado cedido por D. J. Parra del servicio de Sanidad Vegetal de Jerez de la Frontera (Cádiz). TP: Tempranillo, VD: Verdejo.

Aislado	Origen	Varietad	Edad	Zona de aislamiento	Síntomas
Y038-05-3a	Valles de Benavente ²	nd	> 20	nd	nd
Y038-05-3z	Valles de Benavente ²	nd	> 20	nd	nd
Y069-06-1c	Ribera del Duero ²	nd	> 5	variedad	nd
Y082-02-5a	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y085-15-1b	Ribera del Duero ²	nd/TP	> 5	variedad	eutipiosis
Y086-15-1a	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y086-15-1x	Toro ²	nd/TP	15-20	variedad	eutipiosis
Y233-05-4a	Rueda ²	nd/VD	17	variedad	yesca
Y104-06-1b	Extremadura	nd/TP	1	portainjerto	Petrio o pie negro
Y108-02-2z	Extremadura	nd/TP	1	inserción de raíz	Petrio o pie negro
Y168-14-2a	Alicante	nd	> 5	variedad	yesca
S016-03-1a ⁴	Rueda ²	R110/TP	6	portainjerto	yesca
INIAb ³	Madrid	nd	nd	nd	nd
CLM 51.6a ⁵	Valencia	nd	nd	nd	nd
Jerez_a ⁶	Andalucía	nd	nd	nd	nd
Jerez_c ⁶	Andalucía	nd	nd	nd	nd
Pal15b ¹	Italia	nd	nd	nd	nd

2.2.1.2. Extracción y purificación de ADN

El ADN genómico de todos los aislados se obtuvo a partir de 35-60 mg de micelio liofilizado conservado a -20 °C y pulverizado con ayuda de un molino vibratorio (Mixwe Mill MM 301 Retsch© GmbH, Germany) durante un minuto a 30 Hz. El extracto resultante fue purificado con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cologne, Alemania) y resuspendido en 75 µl de agua milliQ estéril. La concentración del ADN obtenido se midió mediante espectrometría (NanoDrop[®], apartado 1.2.5.4 del Capítulo 1). Las suspensiones iniciales fueron conservadas a -20°C. Posteriormente para la realización de los distintos ensayos, los ácidos nucleicos fueron diluidos hasta una concentración 10 ng/µl por muestra. Todas las extracciones se realizaron por duplicado partiendo de dos replicas del micelio liofilizado para cada uno de los aislados estudiados.

2.2.1.3. Marcadores AFLP

El análisis de AFLP fue realizado por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León utilizando los ADNs purificados en

nuestro laboratorio. El proceso de obtención de marcadores de tipo AFLP conlleva tres pasos diferenciados:

i. Restricción-Ligación

Antes de la amplificación se realizó una digestión de 250 ng de ADN con las endonucleasas *EcoRI* y *MseI* (5 U cada una) de acuerdo con las instrucciones del proveedor (New England BioLabs). Posteriormente se ligaron los adaptadores *EcoRI* y *MseI* al ADN digerido de forma simultánea. Para ello se utilizaron 0,1 U de T4 *Ligasa* (NEB), 100 pmol del adaptador *MseI* y 10 pmol del adaptador *EcoRI* en un volumen final de 20 μ l. La reacción se mantuvo a 37 °C durante 12 horas. Los productos obtenidos fueron diluidos 1:10 con agua ultra pura.

ii. Amplificación preselectiva

La reacción preselectiva se realizó con 4 μ l de la mezcla diluida obtenida tras los procesos de digestión y ligamiento. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μ l utilizando 0,02 μ M de los primers *EcoRI*-A y *MseI*-C, 0,12 mM dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 μ l de ADN polimerasa (KAPATaq PCR kit, KAPA Biosystems) y 1x del tampón proporcionado con la enzima. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de 72 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos, concluyendo con un paso de extensión final a 60 °C durante 10 minutos. Los productos obtenidos fueron diluidos 1:10 con agua ultrapura antes de ser utilizados en la amplificación selectiva.

iii. Amplificación selectiva

La reacción selectiva se preparó en un volumen final de 10 μ l utilizando 0,05 μ M del primer *Eco*-AA, 0,25 del primer *Mse*- C, 0,12 mM dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 0,25 de la Taq ADN polimerasa (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems), 1x del tampón proporcionado con la enzima y 2 μ l del producto diluido obtenido en la amplificación preselectiva. Las condiciones de amplificación consistieron en 37 ciclos con un paso inicial de 94 °C durante 2

minutos. Los primeros 13 ciclos consistieron en desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 65 °C durante 30 segundos (con reducción de 0,7 °C por ciclo) y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Los 24 ciclos restantes consistieron en desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200.

Para efectuar el análisis de AFLP se seleccionaron cinco combinaciones de marcadores que aportaron una buena resolución y un apropiado número de bandas polimórficas: *EcoRI-AA/MseI-CGA*, *EcoRI-AA/MseI-CC*, *EcoRI-AA/MseI-CG*, *EcoRI-AA/MseI-CT* y *EcoRI-AA/MseI-CA*. La reproducibilidad de los fragmentos amplificados con estas cinco combinaciones se comprobó dos veces, realizando todas las reacciones por duplicado a partir de dos extracciones independientes de ADN por aislado. Las muestras se analizaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador MegaBACE 500 (Amersham Biosciences), empleando el marcador de pesos moleculares ET550-R (Amersham Biosciences).

2.2.1.4. Análisis de datos

Para el análisis de los resultados se utilizó el software específico GeneMarker (SoftGenetics LLC TM), que permite identificar y asignar los diferentes alelos a cada una de las muestras. Todos los datos obtenidos por el GeneMarker fueron verificados de forma manual. Se seleccionaron picos suficientemente altos y simétricos, y siempre reproducibles de tamaños comprendidos entre 100 y 510 pb. Para cada fragmento amplificado existen dos alternativas fenotípicas, presencia o ausencia de pico, que corresponden a dos genotipos, dado que los hongos analizados son haploides. Los marcadores fueron puntuados asignándose 1 a la presencia de producto amplificado y 0 a la ausencia para cada uno de los 52 aislados monospóricos analizados. A partir de los datos binarios se realizó un *fingerprinting* y un análisis estadístico de bandas.

Se construyó una matriz de identidad o similitud a partir del índice de identidad de Jaccard (IJ_{xy}) que determina la media de similitud genética entre

dos aislados x e y mediante la siguiente fórmula [Fórmula 2.2.1]: $IJ_{xy} = a / (a+b+c)$, donde: a es el número de bandas comunes en dos aislados; b es el número de bandas presentes en x pero no en y ; y c es el número de bandas exclusivas de y . Este índice es el más sencillo de todos y tiene la desventaja de que no pondera las frecuencias de cada uno de las bandas amplificadas (Jaccard, 1908). Se construyó un dendograma utilizando el método de Neighbour-Joining, una vez convertida la matriz de similitud en distancias como $1-IJ_{xy}$. Se desarrolló un remuestreo bootstrap con 100 réplicas para determinar el soporte de la topología y de los grupos diferenciados en el dendograma.

Además se estimó la proporción de fragmentos compartidas (Q_x) según la fórmula propuesta por Nei & Takezaki (1994) [Fórmula 2.2.2], para calcular la proporción de bandas compartidas para RAPDs, donde p_{xi} es la frecuencia del genotipo presencia de pico (o banda) en todos los cultivos monospóricos estudiados de una población xi .

[Fórmula 2.2.2]

$$Q_x = \frac{\sum_{xi=1}^n p_{xi}^2}{\sum_{xi=1}^n p_{xi}}$$

La variabilidad genética de cada especie (K_x) fue medida por la expresión: $K_x = 1 - Q_x$ (Nei & Kumar, 2000), considerando todos los aislados de una especie como una única población xi .

Para medir el grado de diferenciación total existente entre los 52 aislados monospóricos estudiados se utilizó el índice R_{ST} , propuesto por Nei & Kumar (2000) como el coeficiente de diferenciación de una población. El índice R_{ST} fue calculado como $R_{ST} = (K_T - K_S) / K_T$, donde K_T es la variabilidad total y K_S es la media de las K_x de las tres especies analizadas.

Basándose en el índice anterior de proporción de bandas comunes (Q_x) se ha desarrollado otra medida (Q_{xy}) para comparar dos poblaciones de aislados diferentes [Fórmula 2.2.3]. Se calcula como la proporción normalizada de bandas compartidas o Q_{xy} (Nei & Takezaki, 1994; Nei & Kumar, 2000): donde

p_{xi} y p_{yi} son las frecuencias del genotipo i -ésimo (presencia de pico o banda) en las poblaciones de los aislados x e y respectivamente.

[Fórmula 2.2.3]

$$Q_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n p_{xi} p_{yi}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n p_{xi}^2 + \sum_{i=1}^n p_{yi}^2}}$$

Este índice está basado en la proporción de picos (o bandas) compartidos y tiene en cuenta la frecuencia con la que aparece un pico. Este índice puede ser aplicado a genomas haploides como es el caso de los hongos estudiados y permitió medir la similitud de las tres especies estudiadas comparándolas dos a dos.

Para probar la hipótesis de recombinación genética dentro de cada especie, se estimaron las probabilidades de desequilibrio gamético por pares de marcadores (Hedrick, 1983). Para ello, se calculó el coeficiente de correlación r entre las frecuencias alélicas de cada fragmento amplificado y se estimó el porcentaje de combinaciones genéticas que presentaron un valor de desequilibrio distinto de cero ($\chi^2 = r^2 2N$; $P \leq 0.05$, $g.l. = 1$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el soporte informático TULKAS diseñado por Sáenz de Miera (Sin publicar).

2.2.2. Detección de *Di. seriata* mediante la técnica SCAR

2.2.2.1. Selección de oligonucleótidos iniciadores y marcadores RAPD

Se realizó una preselección de los oligonucleótidos iniciadores con los 20 oligonucleótidos de cada una de las tres serie OPERON OPA, OPD y OPE (Operon technologies, La Jolla, California, USA). La amplificación se llevó a cabo con ADN de 23 aislados de *Di. seriata* (Tabla 2.2.5), cinco aislados de *Di. mutila*, tres aislados de *N. parvum*, un aislado de *B. dothidea* y un aislado de *Do. iberica* (Tabla 2.2.6). La amplificación de cada aislado fue repetida un mínimo de dos veces y se incluyó una reacción sin ADN molde como control negativo.

Para la amplificación se utilizó el preparado Illustra TM puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μl a la que se adicionó MgCl_2 hasta una concentración 1 mM y se emplearon 50 ng de ADN fúngico purificado según lo descrito anteriormente en el apartado 2.2.1.2. Los ciclos de amplificación consistieron en desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 34 °C durante 1,5 minutos y elongación de las cadenas a 72 °C durante 2 minutos, seguidos de un paso de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® 7200 (Applied Biosystems). Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x (TAE 10x: 48,4 g de Tris base, 11,42 ml de ácido acético glacial y 20 ml de EDTA 0,5 M pH 8, ajustado a un volumen final de un litro y pH 8,3). Como marcador molecular se empleó el PCR Marker 50-2000 pb (Sigma). Los geles se tiñeron en solución acuosa de bromuro de etidio (0,2 ng/ml) durante 15 minutos y se fotografiaron bajo luz ultravioleta (gelDoc 1000 Bio-Rad).

Los oligonucleótidos que mostraron patrones con un número de bandas fácilmente distinguibles, de intensidad uniforme y altamente reproducibles fueron seleccionados. El tamaño del fragmento y la proximidad de otras bandas fueron los criterios establecidos para seleccionar el mejor marcador específico de *Di. seriata*.

2.2.2.2. Clonación y secuenciación

La clonación del fragmento marcador seleccionado (~1200pb), obtenido con el oligonucleótido OPE20, se realizó utilizando 11 aislados de *Di. seriata*: Napa-c, CBS112555a, Y46-1-1b, Y62-1-1c, Y79-4-3a, Y90-10-1a, Y103-4-3a, Y112-24-1a, Y116-10-1c, V14-2a y R21-1a (Tabla 2.2.5). El marcador seleccionado fue separado por electroforesis en gel de agarosa, cortado mediante escisión manual con un bisturí y purificado con GFX PCR DNA Purification kit (Amersham Biosciences GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del proveedor.

El fragmento de ADN purificado de cada aislado fue clonado usando TOPO® TA Cloning® (Invitrogen Lifetechnologies, USA), siguiendo las

indicaciones del proveedor. La reacción de clonación se efectuó en un volumen final de 6 µl con 10 ng de vector pCRTM2.1-TOPO[®], 4µl de la banda OPE-20 de 1200 bp (inserto) y 10 mM de MgCl₂ con incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Para la transformación se utilizaron 2 µl de la reacción anterior (vector con inserto) por cada vial One Shot[®] Chemically Competent que contenía la cepa DH5αTM-T1^R de *Escherichia coli*, de acuerdo con el protocolo descrito por el proveedor. Las bacterias se extendieron en placa Petri con medio LB (Luria-Betani, Invitrogen) enriquecido con 50 µg/ml de ampicilina (Invitrogen) y 40 µg/ml de X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D Galactopiranososa, 5% en N,N-dimetilformamida p/v) (Invitrogen) y se dejaron crecer a 37 °C durante una noche.

Para cada uno de los 11 aislados se eligieron cinco clones transformantes positivos (colonias blancas) seleccionados en medio sólido LB enriquecido. Cada clon se puso a crecer en medio LB líquido más ampicilina durante una noche a 37 °C con agitación. El ADN de cada clon transformado fue purificado utilizando PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen Lifetechnologies, USA), que permite la extracción del plásmido, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se secuenció el ADN del inserto de cada clon utilizando el oligonucleótido universal M13, según lo descrito en el apartado 1.2.5.5.

2.2.2.3. Diseño de oligonucleótidos específicos

Las secuencias obtenidas fueron editadas con Chromas v 1.45 (Conor McCarthy, School of Health Sciences Griffith University, Southport, Australia) y alineadas con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). A partir del fragmento presente en el mayor número de aislados y clones analizados se generó una secuencia consenso que posteriormente fue empleada para diseñar oligonucleótidos específicos. Tres oligonucleótidos iniciadores denominados: DS3.8 S3, DS3.8 R4 y DS3.8 R6 (Tabla 2.2.4), fueron diseñados con la herramienta disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>.) y sintetizados por la compañía Metabion (Martinsried, Germany).

Tabla 2.2.4. Oligonucleótidos específicos diseñados para la identificación y detección específica de *Di. seriata*.

Región diana	Tipo	Nombre	Secuencia 5' → 3'
DS3.8	sentido	DS3.8 S3	ATCCTCATACTACGGCACGG
DS3.8	antisentido	DS3.8 R4	CCGTAGTCTCCCCTTTCCTC
DS3.8	antisentido	DS3.8 R6	AACGGTGACCCATTCCAC

2.2.2.4. Amplificación por PCR

Los oligonucleótidos específicos fueron combinados en dos reacciones distintas de PCR. La mezcla de cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µl utilizando 1x Amp tampón de PCR (XNAP Kit), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 1 µl del extracto de ADN fúngico obtenido según lo descrito en el apartado 1.2.5.1 (Capítulo 1). Las condiciones de amplificación se optimizaron siguiendo un ciclo inicial de 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a distintas temperaturas (de 57 °C a 60 °C) durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos, concluyendo con un paso de extensión final a 72 °C durante 7 minutos. El producto amplificado fue sometido a una electroforesis al 1,5 % en TBE 1x y visualizado mediante exposición a luz ultravioleta (apartado 1.2.5.3, Capítulo 1). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® 7200 (Applied Biosystems).

2.2.2.5. Especificidad de los oligonucleótidos SCAR

Para probar la especificidad del sistema se utilizaron un total de 47 aislados de la especie *Di. seriata* (Tabla 2.2.5) y 29 aislados de ocho especies de la familia Botryosphaeriaceae: nueve aislados de *Di. mutila*; siete aislados de *Neofusicoccum parvum*; tres aislados de *Botryosphaeria dothidea*, tres aislados de *Dothiorella iberica*, tres aislados de *Do. sarmentorum*, dos aislados de *Lasiodiplodia theobromae*, un aislado de *N. luteum* y un aislado de *N. australe* (Tabla 2.2.6).

Tabla 2.2.5. Aislados de *Di. seriata* (47) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para identificar *Di. seriata*. En negrita se marcan los 23 aislados utilizados en la preselección de los mejores oligonucleótidos OPERON (series OPA, OPD y OPE) para seleccionar marcadores RAPD específicos de *Di. seriata*. ¹: Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. * 11 aislados elegidos para realizar los experimentos de clonación.

Especie	Aislado	Origen
<i>Diplodia seriata</i>	CBS719.85c¹	Nueva Zelanda
<i>Di. seriata</i>	* Napa-c	California, USA
<i>Di. seriata</i>	* CBS112555a¹	Portugal
<i>Di. seriata</i>	* Y46-1-1b	Cigales ²
<i>Di. seriata</i>	Y46-8-1b	Cigales ²
<i>Di. seriata</i>	* Y62-1-1c	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y63-4-1b	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	* Y79-4-3a	Ribera del Duero ²
<i>Di. seriata</i>	Y84-1-1a	Toro ²
<i>Di. seriata</i>	Y87-3-1c	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y87-8-1a	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	* Y90-10-1a	Navarra
<i>Di. seriata</i>	Y103-3-3b	Extremadura
<i>Di. seriata</i>	* Y103-4-3a	Extremadura
<i>Di. seriata</i>	Y111-27-1	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	* Y112-24-1a	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	* Y116-10-1a	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y116-27-96	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y121-15-4	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y122-44-91	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y125-12-1b	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y126-73-91	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y126-83-91	Arribes ²
<i>Di. seriata</i>	Y128-3-1b	Galicia
<i>Di. seriata</i>	Y161-1-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y163-11-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y163-13-1a	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y168-21-1b	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y169-11-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y169-18-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y169-18-2	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y170-8-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y171-3-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y172-12-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y172-19-3	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y173-14-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y173-17-1	Alicante
<i>Di. seriata</i>	Y178-1-1	La Rioja
<i>Di. seriata</i>	Y178-11-1a	La Rioja
<i>Di. seriata</i>	Y180-20-1	La Rioja
<i>Di. seriata</i>	Y181-9-1	Tierra de León ²
<i>Di. seriata</i>	Y181-13-1b	Tierra de León ²
<i>Di. seriata</i>	Y181-21-1	Tierra de León ²
<i>Di. seriata</i>	Y213-8-2c	Córdoba
<i>Di. seriata</i>	Y221-14-3a	Rueda ²
<i>Di. seriata</i>	* V14-2a	Vivero, España
<i>Di. seriata</i>	* R21-1a	Vivero, España

Tabla 2.2.6. Aislados de Botryosphaeriaceae spp. (29) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para la identificación de *Di. seriata*. En negrita se marcan los aislados utilizados en la preselección de los mejores oligonucleótidos OPERON (series OPA, OPD y OPE) para seleccionar marcadores RAPD específicos de *Di. seriata*. Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³:Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid).

Especie	Aislado	Origen
<i>Diplodia mutila</i>	CBS431.82 ¹	Países Bajos
<i>Di. mutila</i>	Y50-5-1c	Ribera del Duero ²
<i>Di. mutila</i>	Y50-7-2b	Ribera del Duero ²
<i>Di. mutila</i>	Y60-7-2a	Tierra de León ²
<i>Di. mutila</i>	Y63-1-1b	Arribes ²
<i>Di. mutila</i>	Y113-7-1	Arribes ²
<i>Di. mutila</i>	Y117-10-1b	Arribes ²
<i>Di. mutila</i>	Y122-10-1	Arribes ²
<i>Di. mutila</i>	Y167-9-1	Alicante
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS110301a ¹	Portugal
<i>N. parvum</i>	INIA_352c ³	Madrid
<i>N. parvum</i>	Y57-8-1b	Vivero, España
<i>N. parvum</i>	Y91-3-1a	Vivero, España
<i>N. parvum</i>	Y108-9-1	Extremadura
<i>N. parvum</i>	Y159-24-1	Castilla La Mancha
<i>N. parvum</i>	Y187-8-1 ²	Ribera del Duero
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Sonoma_c	California, USA
<i>B. dothidea</i>	CBS110302 ¹	Portugal
<i>B. dothidea</i>	Y264-19-1 ²	Vivero, España
<i>Dothiorella iberica</i>	Y51-4-3a	Tierra de León ²
<i>Do. iberica</i>	Y81-1-2 ²	Ribera del Duero
<i>Do. iberica</i>	Y190-3-3 ²	Ribera del Duero
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS120.41 ¹	Noruega
<i>Do. sarmentorum</i>	Y51-4-3b	Arribes ²
<i>Do. sarmentorum</i>	Y262-12-1	Vivero, España
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS110.11	nd
<i>L. theobromae</i>	Y512-03-1	Vivero, España
<i>Neofusicoccum luteum</i>	*CBS110299 ¹	Portugal
<i>Neofusicoccum australe</i>	Y264-21-1	Vivero, España

En el estudio de especificidad también se utilizó ADN de 24 aislados de 16 especies fúngicas diferentes (Tabla 2.2.7) la mayoría de ellas asociados a los decaimientos de la vid (*Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cylindrocarpon* spp., *Phomopsis viticola*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Stereum hirsutum* y *Cryptovalsa ampelina*) y ADN de *Vitis vinifera* cvs. Tempranillo y Viura.

Todos los aislados fueron testados bajo las mismas condiciones de amplificación, y cada uno de los ADN fue previamente amplificado con los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 para comprobar la viabilidad de la muestra.

Tabla 2.2.7. Aislados de otras especies (24) utilizados para probar la especificidad de los oligonucleótidos SCAR diseñados para la identificación de *Di. seriata*. Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León.⁴: Aislados cedidos por el Dr. P. García-Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Aldearrubia (Salamanca).

Especie	Aislado	Origen
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS631.94b ¹	Italia
<i>Pm. aleophilum</i>	Y082-02-5c	Toro ²
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	CBS101359 ¹	Italia
<i>Pa. chlamydospora</i>	Y170-03-1	Alicante
<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>	V049-01c	Vivero, España
<i>C. macrodidymum</i>	Y266-10-1	Vivero, España
<i>C. liriiodendri</i>	Y111-07-2c	Arribes ²
<i>C. liriiodendri</i>	Y262-27-1	Vivero, España
<i>C. olidum</i>	Y160-23-2	Castilla La Mancha
<i>C. olidum</i>	Y160-57-1a	Castilla La Mancha
<i>C. olidum</i>	Y264-22-1	Vivero, España
<i>C. pauciseptatum</i>	S018-03-1 ⁴	Salamanca ²
<i>C. pauciseptatum</i>	S020-02-2 ⁴	Salamanca ²
<i>Phomopsis viticola</i>	Y529-07-1	Vivero, España
<i>P. viticola</i>	Y264-17-1	Vivero, España
<i>Eutypa lata</i>	Y249-4-4	Toro ²
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Y255-14-1	Ribera del Duero ²
<i>Stereum hirsutum</i>	Y112-29-1	Arribes ²
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	Y231-05-4 ²	Ribera del Duero ²
<i>Fusarium oxysporum</i>	Y239-1-5	nd
<i>Alternaria solani</i>	CBS109157 ¹	USA
<i>Acremonium</i> sp.	Y161-9-2	Alicante
<i>Epicoccum</i> sp.	TP32-1C1	Valladolid ²
<i>Psathyrella</i> sp.	Y266-4-1	Vivero, España

2.2.2.6. Sensibilidad de los oligonucleótidos SCAR

Con las dos combinaciones de los oligonucleótidos se realizó un ensayo de sensibilidad para conocer el límite de detección. En la determinación de la sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados se utilizó el ADN del aislado de referencia CBS719.85 (purificado según lo descrito en el apartado 2.2.1.2).

Para ello se prepararon seis diluciones, de modo que cada tubo de reacción contenía 1000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 pg de ADN. Cada una de las concentraciones fue analizada 10 veces de forma independiente.

2.2.2.7. Utilidad de los oligonucleótidos SCAR

Para probar las ventajas de las nuevas reacciones de PCR se inocularon 12 plantas de vid (R110/cv. Tempranillo) de un año de edad con dos aislados diferentes de *Di. seriata*: Y103-4-2a e Y116-10-1c.

Se realizó una incisión en el tronco de cada vid con ayuda de un bisturí estéril. En los cortes, de poca profundidad y de aproximadamente 1,5 cm de longitud, se depositó un fragmento de PDA con micelio fresco. Antes de sellar el corte con Parafilm® se volvió a cerrar el corte asegurando que la cara miceliar contactaba con los tejidos vasculares (Figura 2.2.1 A). Siguiendo el mismo procedimiento se inocularon 12 plantas de vid con fragmentos de PDA sin micelio fúngico, que fueron utilizadas como control. Las plantas se mantuvieron en un invernadero a una temperatura de 20-25 °C.

Cuatro meses después, se cortaron las plantas (Figura 2.2.1 B) y se efectuaron aislamientos a 1 cm por encima del la zona inoculada siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3).



Figura 2.2.1. A: Método de inoculación empleado en plantas jóvenes. B: Corte transversal realizado cuatro meses después de la inoculación con *Di. seriata*. C: Corte transversal realizado cuatro meses después de la inoculación con *Pm. aleophilum*.

Los aislados obtenidos identificados por criterios morfológicos como Botryosphaeriaceae spp. fueron sometidos a dos tipos de análisis:

-Extracción de ADN, seguida por la amplificación y digestión del fragmento ITS1-NL4 con endonucleasas (ver Capítulo 1).

-Extracción de ADN y amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos SCAR específicos DS3.8 S3-DS3.8 R4 o DS3.8 S3-DS3.8 R6 en reacciones independientes.

Para este ensayo las extracciones de ADN se realizaron con el kit REDEExtract-N-Amp (apartado 1.2.5.1, Capítulo 1).

2.2.3. Detección de *Pm. aleophilum* mediante PCR a tiempo real

2.2.3.1. Diseño de oligonucleótidos y sonda

En el diseño del sistema de amplificación específica de *Pm. aleophilum* por PCR a tiempo real se empleó la secuencia parcial del gen de la β -tubulina amplificada con los oligonucleótidos universales T1 y Bt2b de 22 aislados (Tabla 2.2.9). La mezcla de la reacción, las condiciones de amplificación y la metodología de secuenciación ha sido previamente detallada en el Capítulo 1 de esta memoria (apartado 1.2.5). Se realizó un alineamiento con CLUSTALW 2.0.5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se obtuvo una secuencia consenso de la especie *Pm. aleophilum*. En el alineamiento se incluyeron ocho secuencias de esta especie procedentes de la base de datos GenBank: DQ173095, DQ173094, EU863466, EU863469, EU863472, EU863468, EU863467 y EU863470. La secuencia consenso de *Pm. aleophilum* fue comparada con secuencias de otras especies del género *Phaeoacremonium* (*Pm. scolyti*: AY579293, EU128091, EU128088, EU260415 y AY579292; *P. viticola*: DQ173105, DQ173107, AF192391 y AF246816; *Pm. hispanicum*: HQ700718, *Pm. iranianum*: DQ173096; DQ173097 y DQ173098; y *Pm. mortoniae*: DQ173109; EF517921, EU863480 y EU863475) para obtener una mayor especificidad del sistema.

Los oligonucleótidos y la sonda utilizados para la amplificación fueron diseñados con el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), y sintetizados por MWG-Biotech AG (Ebensburg, Alemania). En total se diseñaron tres sistemas alternativos: el primero basado en el intrón 1, el segundo basado en la región comprendida entre los intrones 1 y 2; y el tercero basado en la región comprendida entre los intrones 3 y 4 (Tabla 2.2.8).

Tabla 2.2.8. Oligonucleótidos y sonda diseñados para la detección específica de *Pm. aleophilum* mediante PCR a tiempo real.

Región diana	Tipo	Nombre	Secuencia
Tamaño fragmento			5' → 3'
Intrón 1 63 pb	sentido	palFI1	CCTCGACGAGCCCAGAATC
	sondaTaqMan [®]	palI1	CCCAGATCATCGACC
	antisentido	palRI1	GTAAAAACCCCACCGGTTAGC
Intrón 1 a 2 140 pb	sentido	palFI1	CCTCGACGAGCCCAGAATC
	antisentido	palRI2	TCAGTCGTCATCCAAGATGC
Intrón 3 a 4 122 pb	sentido	palFI3	CCAACGCGACATCGATACTA
	antisentido	palRI4	CAAATTAGGGCGGTGAACAT

2.2.3.2. Condiciones de amplificación

Las extracciones de ADN se realizaron siguiendo lo descrito en el apartado 2.2.1.2.

SYBER[®] Green PCR. La optimización y comparación de cada uno de los tres pares de oligonucleótidos diseñados fue realizada mediante PCR con la tecnología SYBER[®] Green. La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 20 µl utilizando Power SYBR[®] Green 1x PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µM de cada primer (sentido-antisentido) y 5µl de ADN genómico. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El programa de amplificación consistió en 10 minutos a 95 °C, 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

TaqMan[®] PCR. Para el par de oligonucleótidos que ofreció mejores resultados con la tecnología SYBER[®] Green se optimizó el programa de amplificación y las concentraciones de los reactivos empleando la tecnología TaqMan[®]. Se incluyó en la reacción una sonda TaqMan[®] homóloga a la secuencia del amplímero obtenido con los mejores oligonucleótidos para aumentar la especificidad y sensibilidad del sistema. La sonda TaqMan[®] fue marcada en el extremo 5' con el fluorocromo HEX (hexaclorofluoresceína) como donador de electrones (*reporter*) y en 3' con BHQ1 (*black hole quencher* 1) como aceptor de electrones (*quencher* no fluorescente). La reacción óptima contenía 1× TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3

μM de cada oligonucleótido, $0,15 \mu\text{M}$ de la sonda TaqMan[®] y $5 \mu\text{l}$ del ADN molde a diferentes concentraciones, en un volumen final de $20 \mu\text{l}$. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) siguiendo el mismo programa descrito para la tecnología SYBR[®] Green. En todos los ensayos se incluyó un control positivo (ADN del aislado Y161-19-2a) y un control negativo (agua MiliQ esterilizada). Los productos de PCR fueron analizados con el programa Sequence Detection System versión 1.2.3 (Applied Biosystems).

En la lectura de los resultados se tuvo en cuenta el ciclo umbral o C_T (*threshold cycle*). El C_T es el ciclo de PCR en el cual el incremento de la fluorescencia se produce por encima de la línea basal y alcanza un umbral pre-establecido por defecto. Se consideró amplificación positiva siempre que el $C_T < 42$, es decir siempre que hubiese señal por encima del umbral establecido antes del ciclo 42. Los resultados con $C_T > 42$ fueron considerados como no detectados.

2.2.3.3. Especificidad del sistema

La especificidad de la tecnología *SYBER[®] Green* se comprobó utilizando el ADN de los 22 aislados de *Pm. aleophilum* incluidos en el diseño del sistema (Tabla 2.2.9) y 22 aislados de otras especies de hongos (Tabla 2.2.10).

Tabla 2.2.9. Aislados de *Pm. aleophilum* (61) utilizados en el ensayo de especificidad del sistema de detección de *Pm. aleophilum* por PCR a tiempo real. En negrita se marcan los 22 aislados que fueron secuenciados para diseñar el sistema. ¹: Aislado procedente de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³: Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid). ⁴: Aislados cedidos por el Dr. P. García Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Aldearrubia (Salamanca). ⁵: Aislado cedido por el Dr. J. García Jiménez, Universidad Politécnica de Valencia (Valencia). ⁶: Aislado cedido por D. J. Parra del servicio de Sanidad Vegetal de Jerez de la Frontera (Cádiz). * 22 Aislados utilizados para analizar la especificidad de la tecnología SYBER[®] Green.

Especie	Aislado	Origen
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	* CBS631.94 ¹	Italia
<i>Pm. aleophilum</i>	* CLM51.6b ⁵	Valencia
<i>Pm. aleophilum</i>	* Jerez_a ⁶	Jerez de la Frontera
<i>Pm. aleophilum</i>	* INIA157a ³	Madrid
<i>Pm. aleophilum</i>	* S001-04-2 ⁴	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	* S004-03-1 ⁴	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	S009-04-1 ⁴	Salamanca ²
<i>Pm. aleophilum</i>	* S016-03-1a ⁴	Rueda ²

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 2.2.9. (Continúa de la página anterior)

Especie	Aislado	Origen
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y038-05-3a	Valles de Benavente ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y069-06-1b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y079-06-4c	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y080-02-1b	Toro ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y082-02-5a	Toro ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y085-09-1b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y085-15-1b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y085-15-2z	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y086-15-1x	Toro ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y089-04-6b	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y089-04-6c	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y104-06-1b	Extremadura
<i>Pm. aleophilum</i>	Y106-04-1b	Extremadura
<i>Pm. aleophilum</i>	Y107-06-1b	Extremadura
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y108-02-2a	Extremadura
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y110-07-1c	Extremadura
<i>Pm. aleophilum</i>	Y112-21-2b	Arribes ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y113-02-2a	Arribes ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y122-21-2a	Arribes ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y160-48-3c	Castilla La Mancha
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y161-19-2a	Alicante
<i>Pm. aleophilum</i>	Y162-06-4	Alicante
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y168-14-2a	Alicante
<i>Pm. aleophilum</i>	Y174-01-1a	Toro ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y179-17-1b	La Rioja
<i>Pm. aleophilum</i>	Y180-04-1a	La Rioja
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y182-01-1a	Tierra del Vino de Zamora ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y201-16-1a	Toro ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y205-18-3c	Cigales ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y213-16-5a	Córdoba
<i>Pm. aleophilum</i>	Y214-19-1b	Córdoba
<i>Pm. aleophilum</i>	Y225-01-6c	Córdoba
<i>Pm. aleophilum</i>	Y229-02-8	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y229-06-7b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y230-03-2b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y231-03-2	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y231-06-2	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y232-06-1b	Ribera del Duero ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y233-05-4b	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y234-03-4	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	*Y235-04-1a	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y261-13-1	Avila ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y261-14-1	Avila ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y263-06-2a	Avila ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y263-12-1	Avila ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y268-13-1	Arribes ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y268-13-3	Arribes ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y272-04-1	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y272-04-4	Rueda ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y273-05-1	Segovia ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y273-10-3	Segovia ²
<i>Pm. aleophilum</i>	Y524-04-4	Vivero, España
<i>Pm. aleophilum</i>	Y524-05-2	Vivero, España

La especificidad de la tecnología *TaqMan*[®] se comprobó utilizando el ADN de un total de 61 aislados de *Pm. aleophilum* (Tabla 2.2.9) y 51 ADNs de aislados de otras especies fúngicas, considerados como controles negativos (Tabla 2.2.10). En el ensayo de especificidad también se incluyó ADN procedente de *Vitis vinifera* cvs. Tempranillo, Garnacha y Viura.

Todos los aislados fueron testados bajo las mismas condiciones de amplificación, y cada uno de los ADN fue previamente amplificado con los cebadores ITS5 e ITS4 para comprobar la viabilidad de la muestra. Todos los ADNs se ensayaron por triplicado en cada reacción y se realizaron un mínimo de tres reacciones independientes.

Tabla 2.2.10. Listado de otras especies de hongos incluidas en el ensayo de especificidad del sistema de detección de *Pm. aleophilum* por PCR a tiempo real. ¹: Aislados procedentes de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³: Aislado cedido por el Dr. J. P. Péros, INRA, Villeneuve-les-Maguelone (Francia). ⁴: Aislados cedidos por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid). ⁵: Aislado cedido por el Dr. P. García Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Aldearrubia (Salamanca). ⁶: Aislados cedidos por el Dr. E. Monte, Universidad de Salamanca, (Salamanca). * 22 Aislados utilizados para analizar la especificidad de la tecnología SYBER[®] Green.

Especie	Aislado	Origen
<i>Phaeoacremonium scolyti</i>	*CBS113593 ¹	Francia
<i>Pm. viticola</i>	*CBS113065 ¹	Sudáfrica
<i>Pm. viticola</i>	Y271-03-1d	Ribera del Duero ²
<i>Pm. hispanicum</i>	Y549-09-3b	Vivero, España
<i>Pm. iranianum</i>	Y277-14-1	La Rioja
<i>Pm. mortioniae</i>	Y270-16-1	Ribera del Duero ²
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	*CBS161.90 ¹	Italia
<i>Pa. chlamydospora</i>	LR47 ³	Hérault, Francia
<i>Pa. chlamydospora</i>	INIA56b ⁴	Madrid
<i>Pa. chlamydospora</i>	Y87-9-1b	Arribes ²
<i>Pa. chlamydospora</i>	Y121-2-91b	Arribes ²
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	*CBS119.41 ¹	Países Bajos
<i>C. macrodidymum</i>	CBS120170 ¹	Eslovenia
<i>C. macrodidymum</i>	Y098-03-2a	Cigales ²
<i>C. liriodendri</i>	*R037-01	Vivero, España
<i>C. liriodendri</i>	Y099-04-1c	Cigales ²
<i>C. olidum</i>	Y112-34-1c	Arribes ²
<i>C. olidum</i>	Y160-57-1a	Castilla La Mancha
<i>C. pauciseptatum</i>	S020-02-2a ⁵	Salamanca ²
<i>Diplodia seriata</i>	*CBS112555 ¹	Portugal
<i>Di. seriata</i>	CBS719.85 ¹	Nueva Zelanda
<i>Di. seriata</i>	Napa-a	California, USA
<i>Di. mutila</i>	*CBS431.82 ¹	Países Bajos
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	*CBS110302 ¹	Portugal
<i>B. dothidea</i>	Sonoma	California, USA
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	*CBS120.41 ¹	Noruega
<i>Do. sarmentorum</i>	Y129-4-1	Vivero, España

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 2.2.10. (Continúa de la página anterior)

Especie	Aislado	Origen
<i>Do. iberica</i>	*CBS115035 ¹	España
<i>Do. iberica</i>	Y81-1-2	Ribera del Duero ²
<i>Do. viticola</i>	*CBS117006 ¹	España
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS110301 ¹	Portugal
<i>N. parvum</i>	INIA352 ⁴	Madrid
<i>N. luteum</i>	*CBS110299 ¹	Portugal
<i>N. australe</i>	Y264-21-1	Vivero, España
<i>N. ribis</i>	*CBS655.77 ¹	Nueva Zelanda
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	*Y501-03-5a	Vivero, España
<i>Phomopsis viticola</i>	*CBS267.80 ¹	Italia
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	*Y231-05-4	Ribera del Duero ²
<i>Stereum hirsutum</i>	*CBS416.61 ¹	Austria
<i>S. hirsutum</i>	Y112-29-1	Arribes ²
<i>Eutypa lata</i>	*CBS101932 ¹	Países Bajos
<i>E. lata</i>	Jerez_a	Jerez de la Frontera
<i>E. lata</i>	Y249-4-1	Toro ²
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	*Y172-04-1	Alicante
<i>F. mediterranea</i>	Y189-22-2b	Cigales ²
<i>Fusarium solani</i>	*Y134-03-1a	Vivero, España
<i>Alternaria solani</i>	*CBS109157 ¹	USA
<i>Trichoderma</i> sp.	NBT ⁶	Sevilla
<i>Helminthosporium solani</i>	CBS640.85 ¹	Países Bajos
<i>Rhizoctonia solani</i>	CBS163.83 ¹	Países Bajos
<i>Colletotricum acutatum</i>	*Imi ⁶	Salamanca ²

2.2.3.4. Sensibilidad del sistema

Para estudiar la sensibilidad del sistema se determinaron dos parámetros:

- El límite de detección (LOD), considerado como la concentración mínima a la que fue posible detectar un analito en el 95% de las reacciones.

- La eficiencia del sistema (E) fue obtenida aplicando la siguiente ecuación: $E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$, que indica la linealidad de la recta, siguiendo las recomendaciones de Bustin *et al.* (2009).

Se realizaron dos estudios diferentes: el primero a partir de concentraciones conocidas de ADN genómico y el segundo a partir de suspensiones de esporas. En ambos casos se utilizaron siete aislados de *Pm. aleophilum*: CBS631.94, Y079-06-4c, Y082-02-5a, Y089-04-6b, Y110-07-1c, Y161-19-2a y Y235-04-1a.

i. ADN genómico

A partir de los ADNs purificados se prepararon cinco diluciones, de modo que cada tubo de reacción contenía 5.000.000, 500.000, 50.000, 5.000 y 500 fg de ADN, respectivamente. Se realizaron tres experimentos independientes, en los cuales cada concentración se analizó por triplicado. Con el ADN del aislado Y161-19-2a se ensayaron además otras cuatro diluciones. Cada tubo de reacción contenía 50, 25, 5 y 1 fg de ADN, respectivamente. Las cuatro últimas concentraciones se analizaron 10 veces en cada uno de los tres experimentos independientes de PCR a tiempo real.

ii. Esporas fúngicas

En el estudio de las soluciones de esporas se llevó a cabo un procedimiento similar. Para la obtención de esporas de *Pm. aleophilum* se partió de placas de micelio crecido en PDA (1 mes de crecimiento) a las que se añadió 1 ml de agua milliQ estéril. Se pipeteó el agua varias veces sobre el micelio para permitir que las esporas se liberasen. El agua se recogió en un tubo eppendorff y se realizaron diluciones seriadas. El recuento de esporas fue realizado en el microscopio con ayuda de una cámara de Neubauer® (BlauBrand, Alemania). La concentración de esporas fue estimada aplicando la fórmula: $\text{Esporas/ml} = N \times 25 \times 10^4$, donde N es el número medio de esporas por celdilla.

A partir de una suspensión de esporas de los siete aislados se prepararon cuatro diluciones, de manera que cada tubo de reacción contenía 30.000, 3.000 y 300 esporas, respectivamente. Para cada una de las diluciones se realizaron tres experimentos independientes, en los cuales cada concentración se analizó por triplicado. Con las esporas del aislado Y161-19-2a se ensayaron otras cuatro diluciones. Cada tubo de reacción contenía 30, 15, 3, 1 espóra, respectivamente. Las cuatro últimas concentraciones se analizaron 10 veces en cada uno de los tres experimentos independientes de PCR a tiempo real.

Con los valores medios del ciclo umbral o C_T (*threshold cycle*) se construyeron sendas curvas estándar, representando los valores de C_T frente al logaritmo de las concentraciones de ADN y esporas, respectivamente. En cada

caso, la pendiente de la recta obtenida se utilizó para calcular la eficiencia del sistema aplicando la ecuación propuesta por Bustin *et al.* (2009).

2.2.3.5. Utilidad del sistema

La utilidad del sistema fue analizada mediante la detección de *Pm. aleophilum* en muestras de madera de vid infectada. Para ello se inocularon 12 plantas de vid (R110/cv. Tempranillo) de un año de edad con tres aislados diferentes: Y108-02-2z, Y038-05-3z e Y235-04-1w. El proceso de inoculación se llevó a cabo según la metodología expuesta en el apartado 2.2.2.7 (Figura 2.2.1 A).

Cuatro meses después, se cortaron las plantas (Figura 2.2.1 C) y se efectuaron aislamientos de *Pm. aleophilum* a 1 cm por encima de la zona inoculada siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3). Los aislados obtenidos fueron identificados por criterios morfológicos y moleculares (ver Capítulo 1).

En base al éxito de la inoculación tras el re-aislamiento de *Pm. aleophilum* se seleccionaron cuatro plantas inoculadas con cada uno de los tres aislados estudiados. Además se muestrearon cuatro plantas control.

De cada planta seleccionada se recogieron tres astillas para continuar con el análisis. A partir de una de las astillas se procedió a la purificación de ADN utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cologne, Alemania) como se ha descrito anteriormente (apartado 2.2.1.2). La segunda astilla fue incubada en un tubo que contenía 150 μ l de medio ME, durante dos días a 25 °C en oscuridad. La tercera astilla fue incubada en un tubo que contenía 150 μ l de agua destilada estéril, en las mismas condiciones.

Finalmente se realizaron reacciones de PCR a tiempo real con la tecnología TaqMan[®] en las condiciones descritas anteriormente (apartado 2.2.3.2). Las reacciones se llevaron a cabo con 5 μ l del ADN purificado obtenido a partir de la primera astilla, 5 μ l de medio ME donde se había incubado la segunda astilla y 5 μ l del agua de incubación de la tercera astilla.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Caracterización molecular mediante AFLP

El examen de los fragmentos amplificados utilizando el oligonucleótido *EcoRI*-AA en combinación con cada uno de los cinco oligonucleótidos *MseI* (*MseI*-CGA, *MseI*-CC, *MseI*-CG, *MseI*-CT o *MseI*-CA) para el estudio de 52 aislados, produjo un total de 672 marcadores. Los patrones obtenidos se reafirmaron en las distintas repeticiones, confirmando la reproducibilidad de la técnica AFLP.

El análisis de los fragmentos amplificados se muestra en la Tabla 2.3.1. Para cada especie, la suma de los fragmentos fijados por ausencia más el número total de fragmentos presentes fue 672. La especie *Pm. aleophilum* proporcionó el mayor número de fragmentos amplificados (358), comparado con *Pa. chlamydospora* (279) y *Di. seriata* (161). El porcentaje de fragmentos polimórficos obtenidos fue claramente superior entre los aislados de *Di. seriata* (86,3 %) y *Pm. aleophilum* (86 %) que entre los aislados de *Pa. chlamydospora* (39 %). Los fragmentos monomórficos alcanzaron un porcentaje del 61 % en la especie *Pa. chlamydospora*, mientras que en *Di. seriata* y *Pm. aleophilum* fueron del 13,7 % y el 14 %, respectivamente (Tabla 2.3.1).

Tabla 2.3.1. Número de fragmentos amplificados en el análisis AFLP de los 52 aislados estudiados (17 de *Di. seriata*, 18 de *Pa. chlamydospora* y 17 de *Pm. aleophilum*). ¹ K_x : Variabilidad genética intra-específica, calculada según Ney & Kumar (2000). ²: Porcentaje de combinaciones gaméticas de dos fragmentos con un valor r de desequilibrio estadísticamente distinto de cero ($\chi^2 = r2N$; $P \leq 0.05$, d.f. = 1).

	<i>Di. seriata</i>	<i>Pa. chlamydospora</i>	<i>Pm. aleophilum</i>
No. de fragmentos fijados por ausencia	511	393	314
No. de fragmentos amplificados	161	279	358
No. de fragmentos polimórficos (%)	139 (86.3%)	109 (39%)	308 (86%)
No. de fragmentos monomórficos (%)	22 (13.7%)	170 (61%)	50 (14%)
K_x ¹	0.281	0.073	0.253
% de desequilibrio gamético ²	7.3%	7.6%	13.6%

El número de fragmentos amplificados (672) no mostró una distribución uniforme entre las tres especies estudiadas. La Figura 2.3.1 muestra un diagrama de Venn en el que se representa el número de fragmentos amplificados que fueron compartidos por dos o tres de las especies estudiadas.

Diplodia seriata y *Pm. aleophilum* compartieron 25 (19 + 6) marcadores polimórficos en ambas especies. Las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* compartieron un total de 80 (74 + 6) marcadores, de los cuáles ocho resultaron ser monomórficos en las dos especies. *Diplodia seriata* y *Pa. chlamydospora* compartieron 27 (21 + 6) marcadores y de ellos cuatro fueron monomórficos en ambas especies. El diagrama de Venn muestra seis marcadores comunes y presentes en las tres especies estudiadas. Uno de ellos resultó ser monomórfico tanto en *Di. seriata* como en *Pa. chlamydospora*; otro monomórfico solamente en *Pm. aleophilum*, y otro únicamente monomórfico en *Pa. chlamydospora*. Los tres restantes fueron polimórficos para las tres especies.

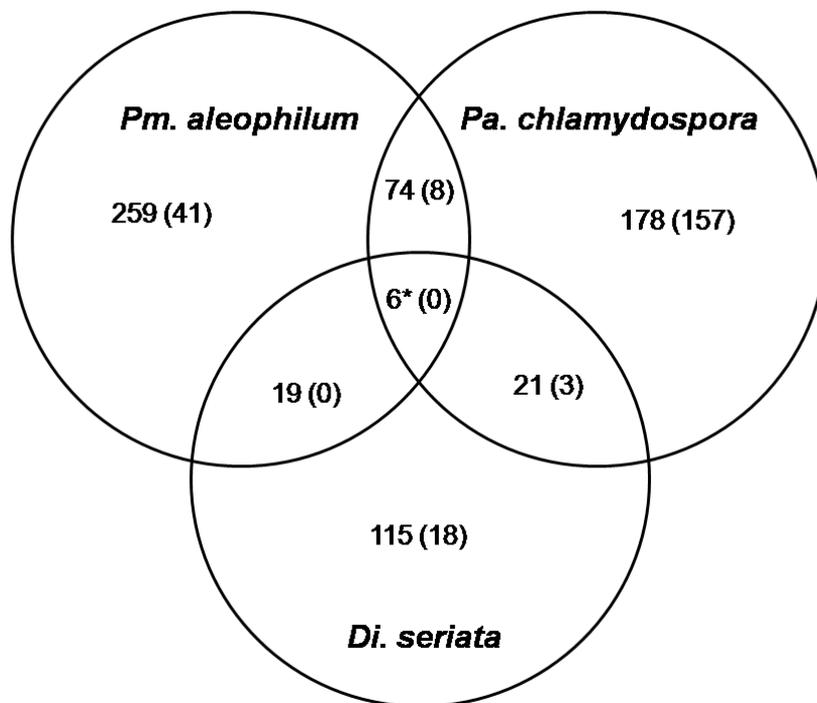


Figura 2.3.1. Diagrama de Venn en el que se muestra la distribución de los marcadores de tipo AFLP obtenidos en este trabajo. Los números entre paréntesis corresponden a marcadores monomórficos compartidos por dos o tres especies. * No se obtuvo ningún marcador monomórfico presente en los 52 aislados analizados.

El dendograma generado (Figura 2.3.2) mostró tres grupos. Cada uno de ellos contenía los aislados de una especie. Comparando las tres especies, la distancia genética fue menor entre las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm.*

aleophilum. A nivel intra-específico se observó una mayor homología entre los aislados de *Pa. chlamydospora*.

La Tabla 2.3.1 muestra los valores de variabilidad genética (K_x) correspondiente a cada una de las tres especies analizadas. *Diplodia seriata* mostró el mayor valor de variabilidad ($K_x = 0,281$). El resultado obtenido para *Pm. aleophilum* fue similar al de *Di. seriata* ($K_x = 0,253$), mientras la menor variabilidad genética correspondió a la especie *Pa. chlamydospora* ($K_x = 0,073$).

El índice R_{ST} , empleado para medir el grado de diferenciación total, fue de 0,688; indicando que la variabilidad entre especies fue el mayor componente de la variabilidad total existente entre los 52 aislados monospóricos estudiados.

La comparación de las tres especies basada en la proporción de fragmentos comunes (Q_{xy}), mostró una mayor similitud entre las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* ($Q_{xy} = 0,21$). *Diplodia seriata* mostró una similitud de 0,108 con *Pa. chlamydospora* y 0,063 con *Pm. aleophilum*.

Estos datos mostraron una buena correspondencia con lo observado en el dendograma de la Figura 2.3.2, que está basado en las distancias genéticas calculadas a partir del Índice de Jaccard.

Finalmente, el porcentaje de pares de marcadores con desequilibrio gamético significativo ($p \leq 0,05$) fue mayor en *Pm. aleophilum* (13,6 %) que en *Di. seriata* (7,3 %) y *Pa. chlamydospora* (7,6 %) (Tabla 2.3.1).

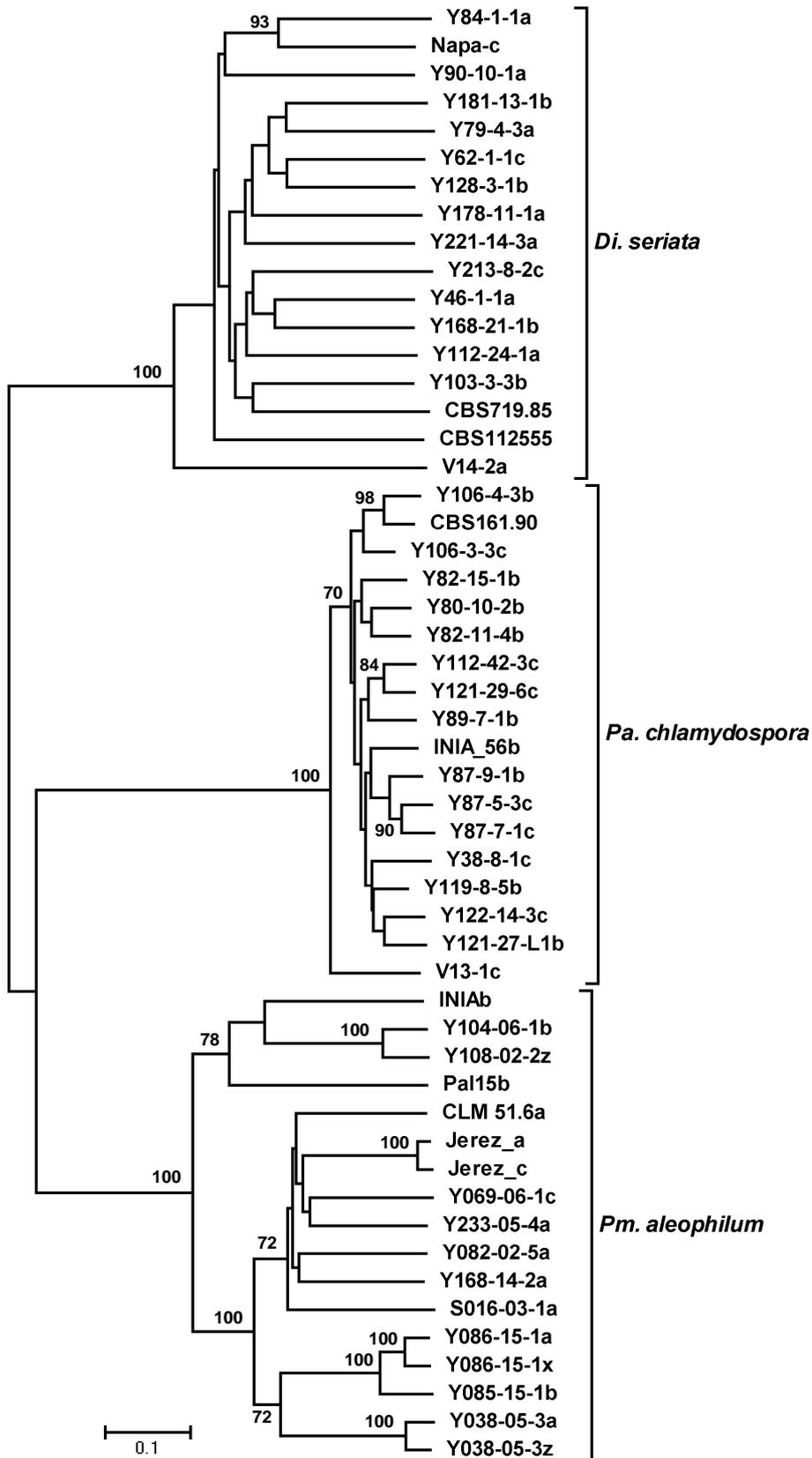


Figura 2.3.2. Dendrograma construido utilizando el método Neighbour-Joining a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{xy})$ de los 52 aislados estudiados mediante AFLP. Los números de los nodos indican valores de bootstrap superiores al 70%.

La técnica AFLP proporcionó un conjunto de patrones genómicos complejos, con capacidad suficiente para diferenciar las tres especies estudiadas.

Los aislados de *Di. seriata* fueron identificados por la amplificación de seis marcadores monomórficos especie-específicos. Cuatro generados con los oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CG* y dos con el oligonucleótido *EcoRI-AA/MseI-CT*.

Los aislados de *Pa. chlamydospora* presentaron un patrón de fragmentos amplificados especie-específico en cuatro de las cinco combinaciones ensayadas. En total se seleccionaron 22 marcadores monomórficos que permiten reconocer la especie *Pa. chlamydospora*. Las combinaciones del oligonucleótido *EcoRI-AA*, con los oligonucleótidos específicos *MseI-CG* y *MseI-CA* fueron las más informativas con seis y nueve marcadores especie-específicos, respectivamente.

El perfil genómico de la especie *Pm. aleophilum* consistió en 11 marcadores AFLP: dos fragmentos especie-específicos generados con los oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CGA*, uno con la combinación *EcoRI-AA/MseI-CT* y seis con los oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CA*. Los tamaños de cada fragmento se muestran en la Tabla 2.3.2.

Tabla 2.3.2. Tamaño (en pb) de los fragmentos especie-específicos obtenidos con la técnica AFLP para *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*, y utilizados para crear un panel de marcadores que permita una detección simultánea de las tres especies.

<i>EcoRI-AA</i>	Oligonucleótido <i>MseI</i>			No. de fragmentos	
	CGA	CC	CG CT CA		
<i>Di. seriata</i>			200 262,334, 413	238, 315	6
<i>Pa. chlamydospora</i>	145, 420, 456	253, 306, 349, 414	194, 272, 320, 340, 350, 386	186, 221, 330, 336, 356, 425, 436, 471, 505	22
<i>Pm. aleophilum</i>	298, 369	230, 312		351 203, 237, 241, 256, 362,374	11

Los resultados obtenidos demuestran que las especies *Di. seriata* y *Pa. chlamydospora* pueden ser diferenciadas utilizando la combinación de oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CG (Figura 2.3.3). Y que las especies *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* pueden ser identificadas simultáneamente utilizando la combinación *EcoRI*-A/*MseI*-CA.

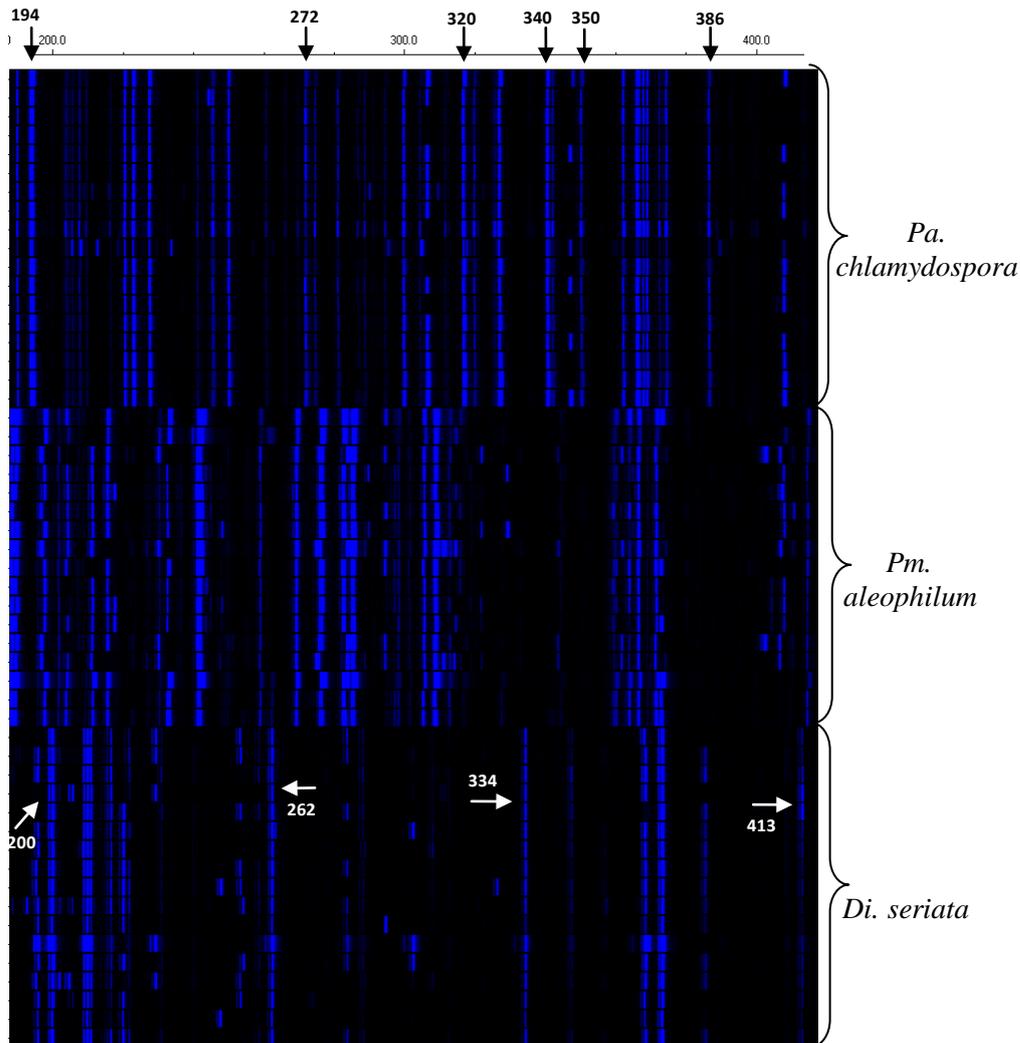


Figura 2.3.3. Imagen del gel mostrada por el programa GeneMarker (SoftGenetics LLC TM) durante el procesamiento de los datos obtenidos con la combinación de oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CG. Las flechas blancas indican los marcadores específicos de *Di. seriata*. Las flechas negras indican los marcadores específicos de *Pa. chlamydospora*.

2.3.2. Detección de *Di. seriata* mediante la técnica SCAR

2.3.2.1. Selección de oligonucleótidos iniciadores y marcadores RAPD

De los 20 oligonucleótidos RAPD evaluados por cada serie OPERON (OPA, OPD y OPE) siete fueron preseleccionados para realizar la caracterización de aislados de *Di. seriata*: OPA2, OPD2, OPD8, OPD16, OPE3, OPE19 y OPE20, porque generaron un número elevado de bandas uniformes, distinguibles y reproducibles.

Los siete oligonucleótidos seleccionados generaron un total de 75 bandas o marcadores. Se encontraron ocho marcadores monomórficos presentes en todos los aislados de *Di. seriata* estudiados: OPD2~1320 pb, OPD8~1100 pb, OPE3~1130 pb, OPE3~600 pb, OPE20~1900 pb, OPE20~1200 pb, OPE20~960 pb y OPE20~795 pb. El oligonucleótido que generó un mayor número de marcadores monomórficos y específicos de *Di. seriata* fue el OPE20. Por esta razón fue utilizado para buscar el mejor marcador útil en el diseño de oligonucleótidos SCAR específicos para identificar *Di. seriata*.

La Figura 2.3.4 muestra los resultados obtenidos tras la amplificación de 17 aislados de *Di. seriata* y un aislado de *Di. mutila* con el oligonucleótido OPE20. El fragmento de ~1900 pb fue descartado por la proximidad de una banda superior y su elevado tamaño. El fragmento de ~960 pb mostró una amplificación más débil en tres de los aislados (Figura 2.3.4) y por ello fue descartado. Entre los marcadores de ~1200 pb y ~795 pb que mostraron una amplificación definida y constante, se eligió el fragmento de mayor tamaño porque ofrecía mayor información para el diseño de oligonucleótidos SCAR.

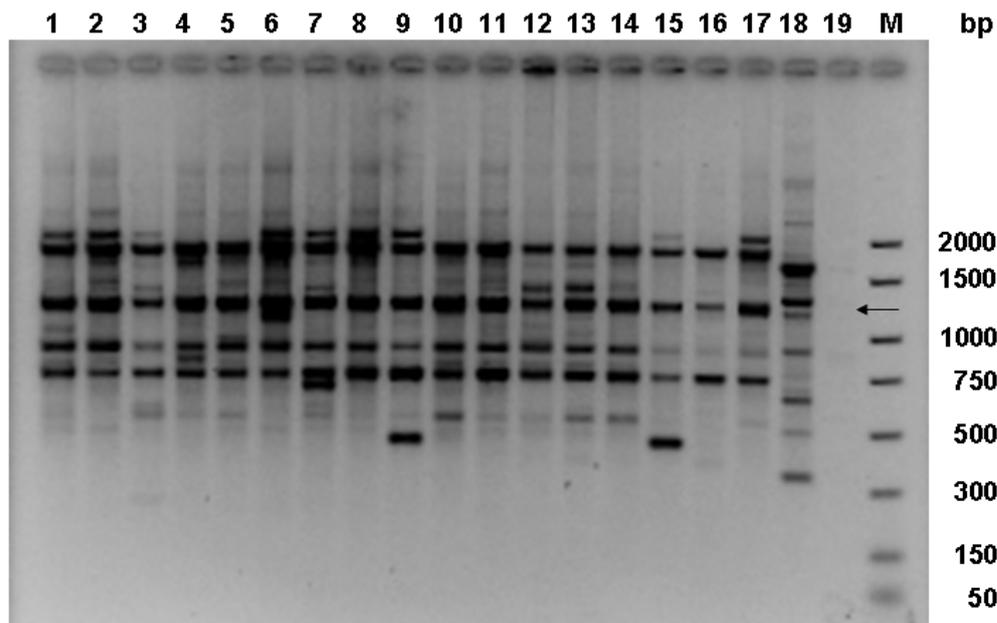


Figura 2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % TAE en el que se muestran los fragmentos amplificados con OPE20. Carriles 1 a 17: aislados de *Di. seriata* (V14-2a, Y79-4-3a, Y103-3-3b, CBS719.85c, Y84-1-1a, Y221-14-3a, Y213-8-2c, Napa-c, CBS112555a, Y62-1-1c, Y90-10-1a, Y46-1-1b, Y112-24-1a, Y128-3-1b, Y168-21-1b, Y181-13-1b, Y178-11-1a); carril 18: aislado Y50-7-2b de *Di. mutila* y carril 19: control negativo. La letra M se corresponde con el PCR Marker (Sigma). El marcador seleccionado de ~ 1200 pb se indica con una flecha.

2.3.2.2. Diseño de oligonucleótidos SCAR

Después de los procesos de clonación y transformación se eligieron al azar cinco clones que contenían el inserto (colonias blancas) de cada uno de los 11 aislados analizados (Napa-c, CBS112555a, Y46-1-1b, Y62-1-1c, Y79-4-3a, Y90-10-1a, Y103-4-3a, Y112-24-1a, Y116-10-1c, V14-2a y R21-1a). Seguidamente se extrajo el plásmido de los 55 clones transformantes y se procedió a la secuenciación del inserto. El alineamiento y análisis de las secuencias obtenidas evidenció la existencia de cuatro fragmentos distintos de ADN (DS7.5, DS4.5, DS4.2 y DS3.8) (Tabla 2.3.3).

El fragmento DS3.8 fue obtenido en 22 de los 55 clones analizados procedentes de 8 de los 11 aislados utilizados para la clonación del marcador OPE20 (Tabla 2.3.3), siendo el más representativo. Por ello el diseño de los oligonucleótidos SCAR de *Di. seriata* se realizó utilizando la secuencia consenso del fragmento DS3.8. Se diseñaron tres oligonucleótidos iniciadores (Tabla 2.2.4) que fueron combinados en dos reacciones de PCR.

Tabla 2.3.3. Resultados obtenidos en el análisis de las secuencias de los 55 clones transformantes estudiados.

Fragmento	Tamaño (pb)	Número clones	% clones	Número aislados	% aislados
DS7.5	1254	9	16%	5	45%
DS4.5	1174	7	13%	5	45%
DS4.2	1170	17	31%	8	73%
DS3.8	1207	22	40%	8	73%

2.3.2.3. Amplificación por PCR

La amplificación con el par de oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4 proporcionó un fragmento específico para *Di. seriata* de 233 pb (Figura 2.3.5) utilizando una temperatura óptima de hibridación de 60 °C (Tabla 2.3.4). La amplificación con el par de oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6 produjo un fragmento específico para *Di. seriata* de 634 pb (Figura 2.3.6) con una temperatura óptima de hibridación de 57 °C (Tabla 2.3.4).

Tabla 2.3.4. Combinación de los tres oligonucleótidos específicos diseñados para la identificación de *Di. seriata* en dos reacciones de PCR y su temperatura óptima de hibridación.

Región diana	Par de oligonucleótidos	Tamaño del fragmento	T^a hibridación
DS3.8	DS3.8 S3/ DS3.8 R4	233 pb	60 °C
DS3.8	DS3.8 S3/ DS3.8 R6	634 pb	57 °C

2.3.2.4. Especificidad de los oligonucleótidos SCAR

Los resultados demostraron que tanto los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4 como los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6 amplificaban únicamente un fragmento del tamaño esperado (~230 pb con DS3.8 S3-DS3.8 R4) (~630 pb con DS3.8 S3-DS3.8 R6) con ADN de *Di. seriata*. La Figura 2.3.5 muestra los resultados de una reacción de PCR realizada con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4 para probar su especificidad. La Figura 2.3.6 muestra los resultados de una reacción de PCR realizada con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6 para probar su especificidad.

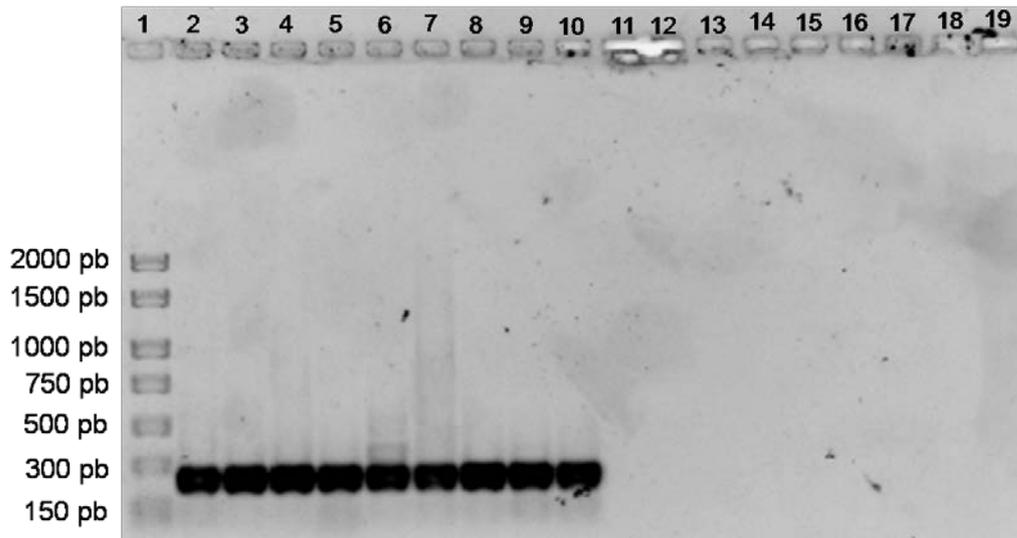


Figura 2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los ampliceros obtenidos con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4. Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 a 10: *Di. seriata* (CBS719.85c, R21-1a; Y46-8-1b, Y63-4-1b, Y87-3-1c, Y111-27-1, Y116-27-96, Y121-15-4 e Y125-12-1b); carriles 11 a 19: controles negativos con ADN de otras especies: *Di. mutila* Y128-10-1 (carril 11), *N. parvum* Y159-24-1 (carril 12), *B. dothidea* CBS110302 (carril 13), *L. theobromae* CBS110.11 (carril 14), *Do. sarmentorum* CBS120.41 (carril 15), *B. iberica* Y81-1-2 (carril 16), *N. luteum* CBS110299 (carril 17), *Pa. chlamydospora* CBS101359 (carril 18) y *Pm. aleophilum* CBS631.94b (carril 19).

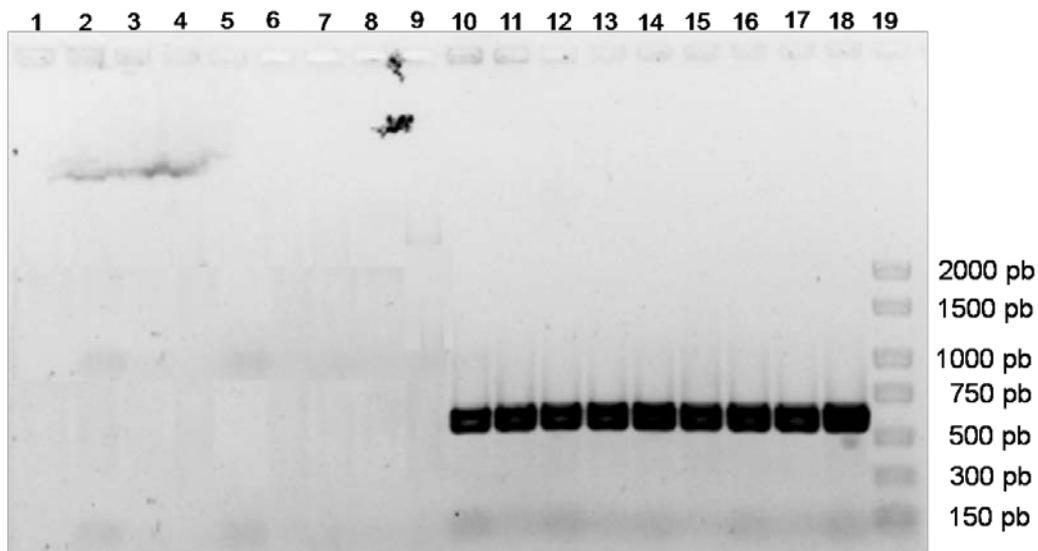


Figura 2.3.6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los ampliceros obtenidos con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6. Carriles 1 a 9: controles negativos con ADN de otras especies: *Di. mutila* Y128-10-1 (carril 1), *N. parvum* Y159-24-1 (carril 2), *B. dothidea* CBS110302 (carril 3), *L. theobromae* CBS110.11 (carril 4), *Do. sarmentorum* CBS120.41 (carril 5), *B. iberica* Y81-1-2 (carril 6), *N. luteum* CBS110299 (carril 7), *Pa. chlamydospora* CBS101359 (carril 8) y *Pm. aleophilum* CBS631.94b (carril 9); carriles 10 a 18 *Di. seriata*: (CBS719.85c, R-21-1a; Y46-8-1b, Y63-4-1b, Y87-3-1c, Y111-27-1, Y116-27-96, Y121-15-4 e Y125-12-1b) y carril 19: marcador de peso molecular.

En ninguna de las dos reacciones de PCR se detectaron amplificaciones con ADN de otras especies. La amplificación del fragmento ITS5 e ITS4 fue positiva en todos los aislados analizados, lo que permitió descartar la existencia de falsos negativos debido a problemas con los ADNs utilizados.

2.3.2.5. Sensibilidad de los oligonucleótidos SCAR

La determinación de la sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados fue estudiada utilizando seis concentraciones de ADN del aislado CBS719.85 como molde (1.000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 pg). El límite de detección de la reacción de PCR con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4 fue de 1 pg de ADN (Figura 2.3.7). Este resultado fue obtenido en tres de las 10 reacciones realizadas para determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos estudiados.

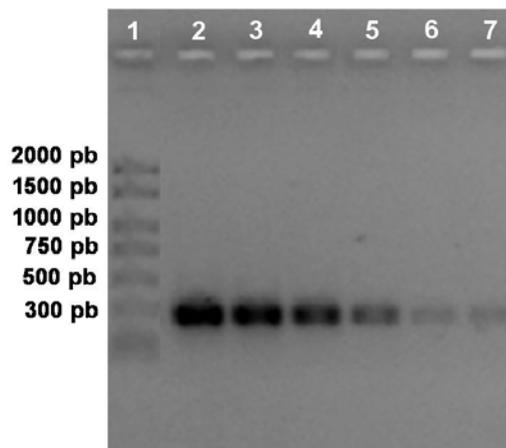


Figura 2.3.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los resultados de sensibilidad utilizando los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 1 a 7: ADN del aislado CBS719.85 de *Di. seriata* (1.000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 pg).

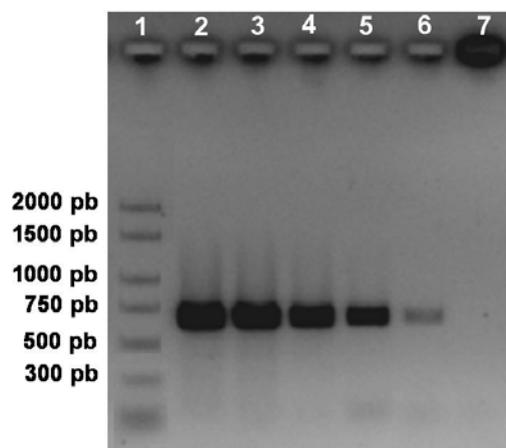


Figura 2.3.8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TBE en el que se muestran los resultados de sensibilidad utilizando los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 1 a 7: ADN del aislado CBS719.85 de *Di. seriata* (1.000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 pg).

La Figura 2.3.8 muestra los resultados observados en tres de las 10 reacciones realizadas para determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6. En este caso se estableció un límite de detección de 0,1 pg de ADN.

2.3.2.6. Utilidad de los oligonucleótidos SCAR

Se utilizaron dos aislados de *Di seriata* (Y116-10-1c e Y103-4-2a) para la inoculación de 12 plantas por aislado. El re-aislamiento de hongos con morfología típica de Botryosphaeriaceae spp. fue exitoso a partir de 10 plantas inoculadas con el aislado Y116-10-1c, obteniéndose 46 re-aislados; y de todas las plantas inoculadas con el aislado Y103-4-2a con un total de 56 re-aislados. A partir de dos de las 12 plantas inoculadas con PDA, utilizadas como control negativo, se contabilizaron seis aislados con morfología típica de Botryosphaeriaceae spp (Tabla 2.3.5).

Tabla 2.3.5. Resultados de la identificación morfológica y molecular mediante digestión enzimática del fragmento ITS1-NL4 de los re-aislados de Botryosphaeriaceae spp. obtenidos a partir de plantas inoculadas.

Aislado inoculado	Identificación morfológica	Identificación molecular por enzimas de restricción		
		<i>Di. seriata</i>	<i>N. parvum</i>	<i>B. dothidea</i>
	Botryosphaeriaceae spp.			
Y116-10-1c (12 plantas)	46 re-aislados (10 plantas)	42 re-aislados (10 plantas)	-	4 re-aislados (1 planta)
Y103-4-2a (12 plantas)	56 re-aislados (12 plantas)	48 re-aislados (12 plantas)	8 re-aislados (2 plantas)	-
PDA (control) (12 plantas)	6 re-aislados (2 plantas)	1 re-aislado (1 planta)	5 re-aislados (2 plantas)	-
TOTAL	108 re-aislados (24 plantas)	91 re-aislados (23 plantas)	13 re-aislados (4 plantas)	4 re-aislados (1 planta)

La identificación molecular de los aislados identificados como Botryosphaeriaceae por criterios morfológicos se realizó siguiendo dos metodologías diferentes:

-Utilizando la amplificación y posterior digestión del fragmento ITS1-NL4, se obtuvieron 42 re-aislados identificados como *Di. seriata*, y cuatro re-aislados identificados como *B. dothidea* de las plantas inoculadas con el aislado Y116-10-1c. En el caso del aislado Y103-4-2a se identificaron 48 re-aislados

como *Di. seriata* y ocho re-aislados como *N. parvum*. De las plantas control se identificó un aislado como *Di. seriata* y cinco aislados como *N. parvum* (Tabla 2.3.5).

-Utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados en este trabajo se identificaron 91 re-aislados de *Di. seriata* por amplificación de un fragmento de 233 pb con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R4 y una banda de 634 pb. con los oligonucleótidos DS3.8 S3 y DS3.8 R6. La reacción de PCR fue negativa cuando se utilizó el ADN de los re-aislados identificados como *B. dothidea* o *N. parvum* mediante la digestión con endonucleasas.

2.3.3. Detección de *Pm. aleophilum* mediante PCR a tiempo real

2.3.3.1. Selección de oligonucleótidos

Como resultado de la amplificación y secuenciación parcial del gen de la β -tubulina (con los oligonucleótidos T1-Bt2b) se obtuvo una secuencia consenso a partir de 22 aislados de *Pm. aleophilum* (Tabla 2.2.9), cuya longitud fue de 652 pb. La secuencia consenso fue alineada con otras secuencias del GenBank de distintas especies del género *Phaeoacremonium*, permitiendo el diseño de tres pares de oligonucleótidos específicos para *P. aleophilum* (Tabla 2.2.8).

La idoneidad de cada uno de los tres pares de oligonucleótidos fue analizada utilizando la tecnología SYBER[®] Green con ADN de los 22 *Pm. aleophilum* empleados en el diseño. Solamente con el par de oligonucleótidos palFI1 y palRI1 (diseñados en el intrón 1 del gen de la β -tubulina), se obtuvo una amplificación positiva para los 22 aislados analizados. El ADN de otras 22 especies fúngicas distintas de *Pm. aleophilum*, así como el ADN de *Vitis vinifera*, no produjo amplificación utilizando los oligonucleótidos palFI1 y palRI1. Por ello, se diseñó una sonda TaqMan[®] en el intrón 1 para continuar el ensayo incrementando la especificidad de la reacción.

2.3.3.2. Especificidad del sistema

La especificidad del sistema seleccionado fue analizada de forma experimental con la tecnología TaqMan[®]. En el análisis se incluyó ADN

purificado de 61 aislados de la especie *Pm. aleophilum* y 54 ADNs de otras especies (*Vitis vinifera* incluido, Tabla 2.2.8). La especificidad obtenida fue del 100 %, ya que se amplificaron todos los aislados de *Pm. aleophilum* y ninguno de los ADN control de otras especies.

2.3.3.3. Sensibilidad del sistema

La determinación de la sensibilidad se realizó a partir de muestras de ADN genómico purificado y esporas de *Pm. aleophilum* de concentración conocida.

i. ADN genómico

Se amplificaron nueve réplicas independientes en un rango de 5 ng a 500 fg de siete aislados de *Pm. aleophilum*. Se seleccionó el aislado Y161-19-2a para ampliar la determinación con treinta réplicas independientes de 50, 25, 5 y 1 fg de ADN. El sistema produjo amplificación positiva en todos los casos ensayados con concentraciones ≥ 500 fg (Tabla 2.3.6).

Tabla 2.3.6. Determinación de los límites de detección obtenidos en el ensayo de PCR a tiempo real (TaqMan[®]) con el ADN genómico del aislado Y161-19-2a de *Pm. aleophilum*.

^a: Ciclo umbral (C_T) \pm el error estándar de la media de todas las reacciones.

fg/reacción	valor C_T ^a	positivos/total
5.000.000	22.00 \pm 0.91	9/9
500.000	25.73 \pm 0.91	9/9
50.000	29.22 \pm 1.01	9/9
5.000	32.67 \pm 1.54	9/9
500	36.17 \pm 1.46	9/9
50	38.92 \pm 1.06	29/30
25	38.90 \pm 1.78	9/30
5	40.89 \pm 0.98	7/30
1	no detectado	0/30

En la Tabla 2.3.6 se muestran los resultados de C_T obtenidos con el ADN purificado del aislado Y161-19-2a. Estos resultados permitieron la construcción de una recta definida por la ecuación: $y = -3,3166x + 44,5520$. El coeficiente de regresión fue $R^2 = 0,9974$. La eficiencia del sistema calculada según Bustin *et al.*, (2009) fue de 1,002 y el LOD fue establecido en 50 fg. Aunque en el 23 % de las reacciones de PCR a tiempo real empleando la tecnología TaqMan[®] se pudo detectar una concentración de 5 fg de ADN.

ii. Esporas fúngicas

En la determinación de la sensibilidad del sistema a partir de esporas, sin previo paso de purificación de ADN, se amplificaron nueve réplicas independientes de 30.000, 3.000 y 300 esporas producidas por siete aislados diferentes de *Pm. aleophilum*. En todas las reacciones la amplificación fue positiva. Con el aislado Y161-19-2a se analizaron treinta réplicas que contenían 30, 15, 3 y 1 espора por reacción, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.3.7. Con los datos obtenidos se construyó una recta estándar definida por la ecuación: $y = -3,6247x + 42,0951$, con un valor $R^2 = 0,9879$. La eficiencia del sistema en este caso fue de 0,926 y el LOD se estableció en 30 esporas. Pero se obtuvo una amplificación positiva en el 70 % de las reacciones que contenían tres esporas.

Tabla 2.3.7. Determinación de los límites de detección obtenidos en el ensayo de PCR a tiempo real (TaqMan®) con las esporas del aislado Y161-19-2a de *Pm. aleophilum*. ^a: Ciclo umbral (C_T) \pm el error estándar de la media de todas las reacciones.

esporas de <i>Pm. aleophilum</i>	valor C_T ^a	positivos/total
30.000	25.92 \pm 0.54	9/9
3.000	29.65 \pm 0.63	9/9
300	32.87 \pm 0.52	9/9
30	36.14 \pm 0.68	29/30
15	37.19 \pm 0.97	24/30
3	40.98 \pm 2.11	21/30
1	no detectado	0/30

2.3.3.4. Utilidad del sistema

La aplicabilidad del sistema de PCR a tiempo real fue ensayada directamente a partir de astillas procedentes de plantas jóvenes inoculadas previamente con tres aislados de *Pm. aleophilum*.

El éxito de las inoculaciones fue analizado mediante el re-aislamiento y la identificación de *Pm. aleophilum* siguiendo los métodos descritos en el Capítulo 1.

Para llevar a cabo este ensayo se eligieron cuatro plantas con resultados del 100 % de re-aislamiento de *Pm. aleophilum* inoculadas con cada uno de los tres aislados (Y108-02-2z, Y038-05-3z e Y235-04-1w) y cuatro plantas control (inoculadas con PDA). De cada planta se recogieron tres astillas.

A partir de una astilla de cada planta se llevó a cabo la purificación de ADN. Cada ADN fue sometido a una PCR a tiempo real utilizando la tecnología TaqMan[®]. El resultado fue positivo en el 100 % de las muestras procedentes de plantas infectadas y negativo en las muestras procedentes de las plantas control. Se confirmaron de este modo los resultados obtenidos con la metodología clásica. Los valores de C_T obtenidos estuvieron comprendidos entre $25,11 \pm 0,26$ y $34,00 \pm 0,40$ (Tabla 2.3.8).

Tabla 2.3.8. Detección de *Pm. aleophilum* a partir de astillas de madera infectada utilizando el sistema de PCR a tiempo real (TaqMan[®]) diseñado. ^a: Ciclo umbral (C_T) \pm el error estándar de la media de todas las reacciones.

astillas de madera	ADN purificado	2 días de incubación	
		ME	Agua
valor C_T ^a			
Y108-02-2z_1	26.93 ± 0.26	no detectado	no detectado
Y108-02-2z_2	25.42 ± 0.13	34.12 ± 2.94	no detectado
Y108-02-2z_4	29.29 ± 0.37	no detectado	no detectado
Y108-02-2z_5	28.94 ± 0.63	no detectado	no detectado
Y038-05-3z_4	31.08 ± 0.47	no detectado	no detectado
Y038-05-3z_5	25.11 ± 0.26	no detectado	no detectado
Y038-05-3z_6	31.27 ± 0.25	33.86 ± 0.60	no detectado
Y038-05-3z_7	32.87 ± 0.37	34.23 ± 1.48	no detectado
Y235-04-1w_1	34.00 ± 0.40	no detectado	no detectado
Y235-04-1w_3	26.02 ± 0.03	no detectado	no detectado
Y235-04-1w_5	26.72 ± 0.27	no detectado	no detectado
Y235-04-1w_7	32.52 ± 0.58	no detectado	no detectado
PDA	no detectado	no detectado	no detectado
% de reacciones positivas	100	25	0

Una astilla de cada planta fue incubada en medio líquido ME. Después de 2 días se tomaron 5 μ l del medio ME que fueron utilizados como ADN molde en la reacción de PCR a tiempo real, sin realizar extracción de ADN. El 25 % de las reacciones ensayadas dieron resultado positivo. El aislado Y038-05-3z fue detectado en dos de las cuatro plantas inoculadas, mientras el aislado Y235-04-1w no fue detectado en ninguna de las muestras ensayadas (Tabla 2.3.8).

La tercera astilla de cada planta fue incubada en agua estéril durante el mismo tiempo. Como se ha descrito en el párrafo anterior se tomaron 5 μ l del agua de incubación y se llevó a cabo una reacción de PCR a tiempo real con el

sistema diseñado. En este caso no se detectó *Pm. aleophilum* en ninguna de las reacciones (Tabla 2.3.8).

2.4. DISCUSIÓN

La identificación específica, rápida, altamente sensible, y con una baja influencia de factores externos, de los hongos asociados a los decaimientos de la vid es crucial para el manejo de estas enfermedades. Los avances en las técnicas de biología molecular pueden ayudar a conseguir este propósito. Los mejores métodos son aquellos que se basan en la utilización de ADN. Entre éstos métodos destacan la PCR convencional (Tegli *et al.*, 2000a), la PCR anidada (nested-PCR) (Edwards *et al.*, 2007; Aroca *et al.*, 2007) y la PCR a tiempo real (Overton *et al.*, 2004; Aroca *et al.*, 2008). El estudio de la variabilidad genética existente entre especies fitopatógenas, mediante marcadores moleculares, es también una valiosa herramienta para determinar sus diferencias y establecer sistemas rápidos de detección múltiple (Alves *et al.*, 2004 y 2007).

Hasta ahora la identificación de *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* implica un trabajo que puede durar varios meses. *Phaeoacremonium* spp. y *Pa. chlamydospora* son especies de crecimiento lento, que a menudo pueden estar ocultas por otras especies de crecimiento más rápido (Tello *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2007). Aunque existen métodos de detección rápida para *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora*, como la amplificación por PCR convencional (Tegli *et al.*, 2000a), su aislamiento y crecimiento en medio de cultivo son todavía indispensables para estudiar la etiología de los decaimientos de la vid y analizar las posibles fuentes de infección.

La identificación de Botryosphaeriaceae spp. mediante caracteres morfológicos requiere largos periodos de tiempo para la producción y la observación de las esporas. Los avances en biología molecular basados en la digestión con endonucleasas (Alves *et al.*, 2005) y la secuenciación parcial de diferentes genes (van Niekerk *et al.*, 2004), han conseguido caracterizar las especies asociadas a los decaimientos de la vid. Gracias a estas técnicas se ha

reducido el tiempo empleado para su identificación (Capítulo 1), porque no se precisa de la sistemática y previa producción de esporas. Sin embargo, la identificación de Botryosphaeriaceae spp. continúa siendo un proceso largo comparado con otras especies para las que existen oligonucleótidos especie-específicos. La digestión con enzimas de restricción y la secuenciación implican la manipulación de un fragmento amplificado por PCR, aumentando así el tiempo y el riesgo de contaminación (Aroca *et al.*, 2008). Mientras que la PCR convencional con oligonucleótidos especie-específicos reduce los pasos de identificación a una sola reacción. Entre las especies de la familia Botryosphaeriaceae, el diagnóstico rápido y específico de *Di. seriata* constituye uno de los grandes retos, dada su importante frecuencia de aislamiento, en torno al 25% en Castilla y León (Capítulo 1).

En este capítulo se han propuesto diferentes metodologías orientadas a la detección rápida y específica de las tres especies mayoritarias: *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Por primera vez se ha realizado un estudio sobre la variabilidad genética de las tres especies mayoritarias asociadas a los decaimientos de la vid con la técnica AFLP.

El dendrograma obtenido con el análisis de agrupamiento de los 672 marcadores generados fue robusto y estuvo de acuerdo con la identidad de los aislados de las tres especies. Así mismo, al estudiar la diversidad genética total se demostró la importancia de la variabilidad entre las especies. Estos resultados indican que la metodología AFLP permite la caracterización molecular y la distinción entre especies de los hongos asociados a los decaimientos de la vid.

Se ha detectado un grado diferente de variabilidad genética en aislados de las especies *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Las cinco combinaciones de oligonucleótidos *EcoRI*-AA con *MseI*-CGA, *MseI*-CC, *MseI*-CG, *MseI*-CT o *MseI*-CA detectaron un alto porcentaje de polimorfismo en *Di. seriata* y *Pm. aleophilum*, y un alto porcentaje de marcadores monomórficos en *Pa. chlamydospora*.

Anteriores estudios sobre la variabilidad genética de *Pa. chlamydospora* han mostrado bajos índices de polimorfismo (Pottinger *et al.*, 2002; Mostert *et al.*, 2006b; Cobos & Martín, 2008). En el presente estudio se han confirmado

estos resultados. La menor variabilidad genética de *Pa. chlamydospora* puede ser interpretada por el bajo grado de recombinación genética de esta especie, dado que su forma teleomórfica todavía no ha sido descrita.

La población de *Pm. aleophilum* mostró una mayor diversidad intra-específica que *Pa. chlamydospora*, confirmando los resultados de Tegli *et al.* (2000b). La forma teleomórfica de *Pm. aleophilum* (*Togninia minima*) ha sido caracterizada (Mostert *et al.*, 2003) y encontrada en la naturaleza (Rooney-Latham *et al.*, 2005). La naturaleza heterotálica de *Pm. aleophilum* puede explicar el mayor nivel de variabilidad genética encontrado.

Esta es la primera vez que se utiliza la técnica AFLP para caracterizar una población de *Di. seriata*. En esta especie se encontró el mayor índice de diversidad genética debido al alto porcentaje de polimorfismo. Estos resultados sugieren un papel activo de la forma teleomórfica de *Di. seriata* (*Botryosphaeria obtusa*) aunque ha sido encontrada raramente en la naturaleza (Jacobs & Rehner, 1998; Martos, 2008). En este trabajo no se han hecho estudios de complementación sexual entre los aislados estudiados, y no se han observado estructuras sexuales de ninguna especie ni en el campo ni en el laboratorio. Nuevos estudios serán necesarios para determinar el papel de factores genéticos y/o ecológicos en la variabilidad genética descubierta.

Los marcadores monomórficos generados en este estudio mediante la técnica AFLP han permitido diferenciar las tres especies analizadas. Utilizando la combinación de oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CG* se han conseguido marcadores especie-específicos para discriminar entre *Di. seriata* y *Pa. chlamydospora*. De un modo similar, marcadores especie-específicos generados con la combinación de oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CA* permiten diferenciar claramente *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Estos resultados han llevado a la creación de un panel de marcadores especie-específicos que puede ser utilizado para analizar muestras de ADN obtenidas directamente de madera de vid, suelo, o incluso agua. El menor número de marcadores monomórficos detectados en las especies *Di. mutila* y *Pm. aleophilum* ha dificultado la selección de un grupo de marcadores AFLP que permita la diferenciación de las tres especies en una sola reacción. Pero con los resultados obtenidos se podrá detectar simultáneamente *Di. seriata*, *Pa.*

chlamydospora y *Pm. aleophilum* realizando únicamente dos amplificaciones de AFLP. Trabajos similares, aplicando las técnicas MSP-PCR (microsatellite-primed-PCR) y rep-PCR, han propuesto patrones específicos de bandas para la identificación de 27 especies de la familia Botryosphaeriaceae (Alves *et al.*, 2007).

La técnica RAPD ha demostrado ser una buena herramienta para la caracterización de marcadores SCAR y el diseño de oligonucleótidos especie-específicos en numerosas investigaciones de organismos fitopatógenos como *Monilinia* spp. (Gell *et al.*, 2007), *Agrobacterium vitis* (Lim *et al.*, 2009) y algunos hongos asociados a los decaimientos de la vid (Lardner *et al.*, 2005). Pollastro *et al.*, (2001) seleccionaron marcadores SCAR, amplificados con decámeros de la serie OPA, para diseñar oligonucleótidos específicos útiles en la detección de *Pa. chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* y *Phomopsis viticola*. Los niveles de sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados por Pollastro *et al.*, (2001) fueron de 0,1 a 1 ng de ADN y su especificidad fue contrastada con nueve especies diferentes.

En el presente trabajo, la búsqueda de marcadores SCAR especie-específicos de *Di. seriata* mediante la técnica RAPD fue exitosa. Utilizando el decámero OPE20, se ha detectado una banda ausente en otras especies de la familia Botryosphaeriaceae y adecuada para el diseño de oligonucleótidos específicos para *Di. seriata*. La especificidad de los nuevos oligonucleótidos fue contrastada con hasta ocho especies distintas de Botryosphaeriaceae y otras 16 especies fúngicas, la mayoría de ellas asociadas con los decaimientos de la vid. Mediante la amplificación por PCR con los pares de oligonucleótidos DS3.8 S3-DS3.8 R4 y DS3.8 S3-DS3.8 R6 descritos en este capítulo es posible detectar de forma específica hasta 0,1 pg de ADN de *Di. seriata*.

Los resultados positivos obtenidos con estos nuevos oligonucleótidos han sido validados mediante la inoculación de plantas con *Di. seriata*. La presencia de *N. parvum* y *B. dothidea* en las plantas jóvenes analizadas, refuerza los resultados descritos en el Capítulo 1, dónde se ha puesto de manifiesto la presencia de estas dos especies en plantas jóvenes asintomáticas. Los datos obtenidos demuestran la necesidad de establecer métodos eficientes de

diagnóstico preventivo, para evitar el desarrollo y la propagación de los decaimientos de la vid.

Se ha demostrado que la técnica de PCR descrita en este trabajo permite la detección rutinaria de *Di. seriata* en un período de tiempo mucho más corto que con la obtención de patrones de restricción. Esta PCR convencional combinada con el rápido crecimiento miceliar de *Di. seriata* en medio de cultivo permitirá procesar un número elevado de muestras y reducir considerablemente el tiempo de diagnóstico.

El sistema de PCR a tiempo real presentado en esta memoria permite detectar hasta 5 fg de ADN o 3 esporas de *Pm. aleophilum*, con un LOD de 50 fg y 30 esporas, respectivamente. Se ha demostrado la robustez del sistema con una eficiencia de 1,002 en la detección de ADN purificado y 0,926 en esporas. La cuantificación del ADN o de las esporas de una muestra puede ser obtenida en pocas horas. Este hecho constituye una gran ventaja frente a los métodos de aislamiento e identificación morfológica o frente al desarrollo de una PCR convencional. Los resultados de la PCR a tiempo real son más reproducibles que los obtenidos por otras técnicas (Edwards *et al.*, 2007; Aroca *et al.*, 2008) y los datos presentados en este trabajo así lo demuestran. Otros sistemas de identificación y detección de *Phaeoacremonium* mediante PCR a tiempo real han sido publicados con anterioridad, pero solamente unas pocas especies fúngicas fueron incluidas para estudiar la especificidad (Overton *et al.*, 2004 y Aroca *et al.*, 2008). La especificidad del sistema diseñado en el presente trabajo fue contrastada con ADN de más de 30 especies distintas, obteniéndose una especificidad del 100%. Los oligonucleótidos propuestos por Overton *et al.* (2004) fueron diseñados en la región ITS, permitiendo la detección únicamente a nivel de género. De forma similar, Aroca *et al.*, (2008) diseñaron un par de oligonucleótidos degenerados en el gen de la β -tubulina capaz de amplificar hasta un total de nueve especies de *Phaeoacremonium*. Su estudio fue completado con el diseño de cuatro sondas especie-específicas que podían ser combinadas en una misma reacción. Una sensibilidad elevada, similar a la encontrada en este trabajo para *Pm. aleophilum*, fue demostrada con ADN de *Pm. parasiticum* (Aroca *et al.*, 2008).

De acuerdo con las ventajas que ofrece una detección múltiple de las principales especies fitopatógenas se ha diseñado un sistema para detectar *Pa. chlamydospora* mediante PCR a tiempo real (Martín *et al.*, 2012) que mejora los anteriormente descritos (Overton *et al.*, 2004 y Edwards *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que ambas especies son de crecimiento lento, pero producen esporas y micelio de forma simultánea, se ensayó la detección de ambas especies a partir de astillas procedentes de plantas inoculadas. Mediante la extracción de ADN directamente de las muestras de madera se detectó la presencia de ambas especies (Martín *et al.*, 2012). Esta metodología reduce considerablemente el tiempo empleado en el proceso de identificación porque evita el cultivo y aislamiento de los hongos en medio de cultivo. Además se incubaron astillas infectadas con *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* en ME y agua, buscando eliminar el proceso de extracción de ADN. Estos líquidos de incubación fueron utilizados como ADN molde en diferentes reacciones de PCR a tiempo real con la tecnología TaqMan[®]. Para *Pm. aleophilum* se obtuvo una amplificación positiva en el 25% de las reacciones desarrolladas con medio ME de incubación, pero el agua de incubación mostró resultados negativos. Se obtuvieron mejores resultados para la especie *Pa. chlamydospora* que mostró amplificación positiva en el 67% y el 42% de las muestras de medio líquido (ME) y agua, respectivamente (Martín *et al.*, 2012).

La detección rápida, específica y fácil a partir de unas pocas esporas sin necesidad de obtener ADN purificado supone una importante ventaja. Esta metodología puede ser adaptada al análisis de un gran número de muestras y ofrece grandes expectativas para la estandarización de un protocolo que garantice un material de propagación sano, libre de hongos asociados a los decaimientos de la vid, en los viveros. Las sondas diseñadas para la detección de *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* fueron marcadas con diferente fluorocromo en el extremo 5' (HEX y FAM, respectivamente) lo que permitirá que ambas especies puedan ser detectadas en una única reacción, tal como ha sido descrito para dos especies de *Phaeoacremonium* (Aroca *et al.*, 2008).

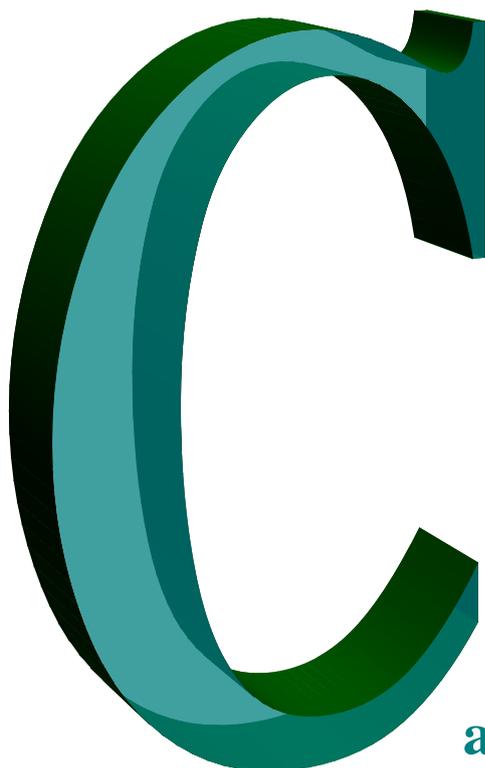
2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz, S., Armengol, J., León, M., García-Jiménez, J. & Abad-Campos, P. (2009). Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research*, 113: 16-23.
- Alves, A., Henriques, I., Fragoeiro, S., Santos, C., Phillips, A.J.L. & Correia, A. (2004). Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Plant Pathology*, 53: 629-634.
- Alves, A., Phillips, A.J., Henriques, I. & Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of Botryosphaeria species. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 221-229.
- Alves, A., Phillips, A.J.L., Henriques, I. & Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158: 112-121.
- Aroca, A. & Raposo, R. (2007). PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2911-2918.
- Aroca, A., Raposo, R. & Lunello, P. (2008). A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 1131-1140.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 165-174.
- Borie, B., Jacquot, L., Jamaux-Despréaux, I., Larignon, P. & Péros, J.P. (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology*, 51: 85-96.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.
- Cobos, R. (2008). Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

- Cobos, R. & Martín, M.T. (2008). Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines of Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.
- Comont, G., Corio-Costet, M.F., Larignon, P. & Delmotte, F. (2010). AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 451-464.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T. & Salib, S. (2007). Comparison of the molecular tests—single PCR, nested PCR and quantitative PCR (Sybr[®]Green and TaqMan[®]) for detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 58-72.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33: 313-315.
- Gell, I., Cubero, J. & Melgarejo, P. (2007). Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2629-2637.
- Groenewald, M., Kang, J.C., Crous, P.W. & Gams, W. (2001). ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Mycological Research*, 105: 651-657.
- Hedrick, P.W. (1983). *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.
- Jacobs, K.A. & Rehner, S.A. (1998) comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia*, 90: 601-610.
- Lardner, R., Stummer, B.E., Sosnowski, M.R. & Scott, E.S. (2005). Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*, 109: 799-808.
- Lim, S.H., Kim, J.G. & Kang, H.W. (2009). Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiological Research*, 164: 451-460.
- Martin, M.T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.

- Martín, M.T., Cobos, R., Martín, L. & López-Enríquez, L. (2012). Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3985-3991.
- Martos, S. (2008). El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87: 448-453.
- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. & Summerbell, R.C. (2003). *Togninia* (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W. & Crous, P.W. (2006a). Taxonomy and Pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54: 1-115.
- Mostert, L., Abln, E.C.A., Halleen, F. & Crous, P.W. (2006b). Genetic diversity among isolates of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 35: 453-460.
- Nei, M. & Takezaki, N. (1994). Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis. *5th World Congress Genet. Appl. Livestock Production*, editado por C. Smith, University of Guelph, Canada, 21: 405-412.
- Nei M, & Kumar S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Overton, B.E., Stewart, E.L., Qu, X., Wenner, N.G. & Christ, B.J. (2004). Qualitative real-time PCR SYBR GREEN detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 403-410.
- Péros, J.P., Jamaux-Despréaux, I. & Berger, G. (2000). Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 150-155.
- Péros, J.P. & Berger, G. (2003). Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 909-919.
- Pollastro, S., Abbatecola, A., Dongiovanni, C. & Faretra, F. (2000). Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in *Phellinus* (*Fomitiporia*) sp. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 107-111.

- Pottinger, B., Stewart, A., Carpenter, M. & Ridgway, H.J. (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 199-211.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A. & Gubler, W.D. (2005) Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease*, 89: 177-184.
- Schmittgen, T. (2001) Real-Time quantitative PCR. *Methods*, 25: 383-385.
- Smetham, G., Ades, P. & Ford, R. (2008). Development of microsatellite markers for the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. *Molecular Ecology Resources*, 8: 1052-1054.
- Tegli, S., Bertelli, E. & Surico, G. (2000a). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 134-149.
- Tegli, S., Santilli, E., Bertelli, E. & Surico, G. (2000b). Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 125-133.
- Tello, M.L., Gaforio, L. & Pastor, S. (2009). Semi-selective media for the isolation of *Phaeoconiella chlamydospora* from soil and vine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 11-19.
- Tello, M.L., Gramaje, D., Gómez, A., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2010). Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 92: 195-203.
- van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Gronewald, J.C., Fourie, P.H. & Hallen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96: 781-798.
- Vos, P., Hogers, M., Bleeker, M., Rijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6.531-6.535.
- Wittwer, C.R., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22: 130-139.



Caracterización molecular y fenotípica de especies del género *Phaeoacremonium* presentes en vid

3.1. ANTECEDENTES

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.2.1. Aislados fúngicos
- 3.2.2. Caracterización molecular mediante la técnica RAPD
- 3.2.3. Caracterización molecular mediante la técnica AFLP
- 3.2.4. Caracterización molecular mediante análisis de secuencias
- 3.2.5. Caracterización morfológica y fenotípica

3.3. RESULTADOS

- 3.3.1. Caracterización molecular mediante la técnica RAPD
- 3.3.2. Caracterización molecular mediante la técnica AFLP
- 3.3.3. Caracterización molecular mediante análisis de secuencias
- 3.3.4. Caracterización morfológica y fenotípica

3.4. DISCUSIÓN

3.5. BIBLIOGRAFÍA

3.-CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE ESPECIES DEL GÉNERO *Phaeocremonium* PRESENTES EN VID

3.1. ANTECEDENTES

El género *Phaeocremonium*, descrito en 1996 con seis especies (Crous *et al.*, 1996), ha sufrido durante los últimos años nuevas incorporaciones y actualmente se conocen 34 especies.

La identificación y descripción de las distintas especies de *Phaeocremonium* se ha basado en la observación de caracteres morfológicos o fenotípicos como la tasa de crecimiento, la textura y coloración del micelio, la relación entre la longitud y anchura de los conidios, la morfología de los conidióforos o el tipo de fiálides. Pero una correcta identificación morfológica puede llevar meses de trabajo, porque las especies de *Phaeocremonium* son de crecimiento lento en medio de cultivo, y requiere de personal especializado y de equipos y técnicas avanzadas de microscopía. Además, la influencia de los factores externos es mayor sobre los caracteres morfológicos o fenotípicos que sobre los caracteres genotípicos. Por ello, cada vez con más frecuencia la identificación de *Phaeocremonium* spp. se apoya, además de en caracteres morfológicos, en la comparación de secuencias de ADN, que ofrecen una información genotípica estable, para la discriminación entre especies.

La región que codifica para los ARNs ribosómicos, junto con las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS) y parte del gen de la β -tubulina fueron las primeras secuencias de ADN estudiadas en *Phaeocremonium* spp. (Dupont *et al.*, 2000 y 2002; Groenewald *et al.*, 2001). Los análisis filogenéticos más recientes, que han permitido describir nuevas especies, se han basado en la secuenciación parcial de los genes de la β -tubulina y la actina (Essakhi *et al.*, 2008; Damm *et al.*, 2008, Gramaje *et al.*, 2009b; Graham *et al.*, 2009). Otras regiones del genoma como parte de los genes de la calmodulina (Mostert *et al.*, 2005) y el factor de elongación 1- α

(FE1- α) (Mostert *et al.*, 2003) también han sido exploradas en *Phaeocremonium* spp. y *Togninia* spp, respectivamente.

Phaeocremonium spp. tiene una distribución mundial y presenta un amplio rango de hospedadores. Diferentes especies han sido aisladas en muestras de suelo, galerías de coleópteros sobre *Quercus robur* y *Fraxinus* sp., y numerosas plantas leñosas con síntomas de decaimiento, entre las que destacan: *Prunus* sp., *Fraxinus* sp., *Quercus* sp., *Salix* sp., *Actinidia deliciosa*, *Olea europea* y *Vitis vinífera* (Mostert *et al.*, 2006a). La posibilidad de que aislados del género *Phaeocremonium* se dispersen de un hospedador a otro ha sido manifestada en distintos trabajos (Di Marco *et al.*, 2004; Damm *et al.*, 2008). Algunas especies de *Phaeocremonium* también han sido descritas como patógenos oportunistas responsables de infecciones en humanos (Guarro *et al.*, 2003; Mostert *et al.*, 2005).

El género *Phaeocremonium* ha sido extensamente estudiado en el campo de la viticultura debido a su relación con la enfermedad de Petri en planta joven y de yesca en planta adulta. Hasta el momento se han descrito 25 especies del género asociadas a los decaimientos de la vid (Tabla III.1, Introducción general). En 2008, Essakhi *et al.* describieron cuatro nuevas especies del género aisladas en plantas con síntomas de yesca muy antiguas (80 - 100 años) y demostraron que tres especies, hasta el momento asociadas únicamente con patologías humanas, también podían causar esta enfermedad en vid. Adicionalmente, confirmaron que *Pm. aleophilum* es la especie más frecuente (80%) en Italia (Essakhi *et al.*, 2008).

En España, la especie mayoritariamente aislada en plantas de vid con síntomas de decaimiento también ha sido *Pm. aleophilum* (Armengol *et al.*, 2001; Martín & Cobos, 2007; Sánchez-Torres *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la preocupación por la presencia *Phaeocremonium* en los procesos de propagación del material vegetal en viveros y en plantaciones jóvenes (Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2010; Gramaje & Armengol, 2011). Desde el año 2006 se ha citado en nuestro país la presencia de *Pm. parasiticum* (Aroca *et al.*, 2006), *Pm. viticola* (Aroca *et al.*, 2007), *Pm. mortoniae* (Gramaje *et al.*, 2007), *Pm. scolyti* (Gramaje *et al.*, 2008), *Pm. inflatipes*, *Pm. iranianum* y *Pm. sicilianum* (Gramaje *et al.*, 2009a),

Pm. cinereum y *Pm. hispanicum* (Gramaje *et al.*, 2009b), todas ellas en planta joven con enfermedad de Petri.

En Castilla y León se han realizado prospecciones en campo desde el año 2001, con el objeto de evaluar la incidencia de yesca y eutipiosis. La especie *Pm. aleophilum* ha sido aislada en la región a partir de plantas con síntomas externos de ambas enfermedades, siendo la única especie del género descrita como patógeno de vid en Castilla y León hasta la fecha (Cobos, 2008).

Pm. aleophilum ha sido la especie de *Phaeoacremonium* asociada con mayor frecuencia a los decaimientos de la vid en todo el mundo (Dupont *et al.*, 2002; Martín & Cobos, 2007; Péros *et al.*, 2008; Essakhi *et al.*, 2008). Este hecho ha promovido el estudio de poblaciones de *Pm. aleophilum* aislados de vid en Italia (Tegli *et al.*, 2000) y Francia (Péros *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2002). Como se ha expuesto anteriormente en el Capítulo 2 de esta memoria, los marcadores moleculares constituyen una herramienta poderosa para el análisis de la variabilidad genética de una determinada especie. Los diferentes trabajos que han abordado la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* utilizando las técnicas RAPD y/o RAMS han demostrado la existencia de varios haplotipos en diferentes regiones vitivinícolas (Tegli *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2002), e incluso dentro de un mismo viñedo (Péros *et al.*, 2000). Pero en ningún caso se encontró relación entre los agrupamientos genotípicos y la región geográfica de procedencia de los aislados estudiados.

La técnica de AFLP ha sido utilizada para el estudio de la variabilidad genética de *Pa. chlamydospora* (Mostert *et al.*, 2006b; Comont *et al.*, 2010) pero no para el estudio de *Pm. aleophilum*.

El objetivo de este Capítulo es caracterizar todas las especies de *Phaeoacremonium* presentes en viñedos de Castilla y León, mediante caracteres morfológicos básicos; marcadores moleculares de tipo RAPD y AFLP; y la secuenciación y comparación de seis regiones genómicas. La variabilidad intra-específica de la especie mayoritaria, *Pm. aleophilum*, ha sido investigada en profundidad.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Aislados fúngicos

3.2.1.1. Material vegetal

Para realizar la caracterización molecular y fenotípica del género *Phaeoacremonium* se disponía de un total de 175 aislados fúngicos conservados en la colección del ITACyL (Capítulo 1), obtenidos a partir de 79 plantas de vid analizadas. Como se ha visto en el apartado 1.3.3.2 del Capítulo 1 la distribución de los aislados fue diferente según los síntomas de decaimiento observados en las plantas de vid. La Tabla 3.2.1 resume los resultados obtenidos para el género *Phaeoacremonium*.

Tabla 3.2.1. Distribución de los aislados de *Phaeoacremonium* según los síntomas de decaimiento observados en las plantas de vid analizadas.

Síntomas de decaimiento	Nº de aislados de <i>Phaeoacremonium</i> (%)	Nº de plantas	Media de aislados por planta analizada
yesca	44 (25,2%)	18	2,4
Black Dead Arm (BDA)	8 (4,6%)	4	2,0
eutipiosis	53 (30,3%)	17	3,1
Petri o pie negro	13 (7,4%)	9	1,4
muerta	2 (1,1%)	1	2,0
otros	7 (4%)	3	2,3
sin síntomas	28 (16%)	17	1,7
no determinado	20 (11,4%)	10	2,0
TOTAL	175 (100%)	79	2,2

El estudio de caracterización fue realizado con aislados obtenidos de 20 muestras de vid diferentes. Las plantas fueron seleccionadas al azar en base a la edad de la muestra, los síntomas de decaimientos de la vid observados y la zona geográfica del cultivo.

Las plantas procedían mayoritariamente de Castilla y León, y fueron representativas de las denominaciones de origen más valoradas y extensas de la comunidad: D.O. Toro, D.O. Ribera de Duero, D.O. Rueda, D.O. Tierra del Vino de Zamora y de una región productora catalogada como vino de calidad: Vino de la Tierra Valles del Benavente. Se incluyeron plantas de vid de las

variedades Tempranillo y Verdejo de gran importancia en el sector vitivinícola de nuestra comunidad (Tabla 3.2.2).

Tabla 3.2.2. Datos de las plantas de vid cultivadas en Castilla y León y analizadas en nuestro laboratorio. ²: Regiones de Castilla y León. TP: Tempranillo, VD: Verdejo. ¹: Entre paréntesis se indica el número de aislados de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Pal: *Phaeoacremonium aleophilum*; Pch: *Phaeomoniella chlamydospora*; Pov: *Phomopsis viticola*; Botry: Botryosphaeriaceae; Fme: *Fomitiporia mediterranea*; Pmo: *Phaeoacremonium mortoniae*; Pvi: *Phaeoacremonium viticola*; Phi: *Phaeoacremonium hispanicum*.

Código planta	Origen Geográfico	Variedad	Edad	Síntomas	Aislados fúngicos ¹
Y038	Valles de Benavente ²	nd/nd	> 20	nd	Pal (2) Pch (1)
Y069	Ribera del Duero ²	nd/nd	> 5	nd	Pal (1)
Y082	Toro ²	nd/TP	15-20	eutipiosis	Pal (1) Pch (7)
Y085	Ribera del Duero ²	nd/TP	> 5	eutipiosis	Pal (4) Pov (2)
Y086	Toro ²	nd/TP	15-20	eutipiosis	Pal (1) Pch (1)
Y182	Tierra del Vino de Zamora ²	nd/nd	> 5	yesca & eutipiosis	Pal (7) Pch (3)
Y233	Rueda ²	nd/VD	17	yesca	Pal (2) Pch (2) Botry (5) Fme (2)
Y235	Rueda ²	nd/VD	> 100	yesca	Pal (1) Pch (1) Botry (5)
Y270	Ribera del Duero ²	nd/TP	> 5	otros	Pmo (1)
Y271	Ribera del Duero ²	nd/TP	> 5	yesca	Pal (1) Pvi (1)
Y549	Valladolid ²	R110/TP	< 5	sin síntomas	Phi (1)

Tres de las muestras vegetales se analizaron en el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia (Salamanca) y los aislados obtenidos fueron cedidos por el Dr. Don P. García-Benavides (Tabla 3.2.3).

Tabla 3.2.3. Datos de las plantas de vid cultivadas en Castilla y León y analizadas en el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia (Salamanca). ²: Regiones de Castilla y León. TP: Tempranillo. ¹: Entre paréntesis se indica el número de aislados de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Pal: *Phaeoacremonium aleophilum*; Pch: *Phaeomoniella chlamydospora*; Cyl: *Cylindrocarpon* spp.; Botry: Botryosphaeriaceae; Ela: *Eutypa lata*.

Código planta	Origen Geográfico	Variedad	Edad	Síntomas	Aislados fúngicos ¹
S001	Ribera del Duero ²	R110/TP	6	yesca	Pal (1) Pch (1) Cyl (1) Botry (2) Ela (1)
S004	Ribera del Duero ²	nd/TP	5	Petri	Pal (1) Pch (1)
S016	Rueda ²	R110/TP	7	yesca	Pal (1) Botry (1)

Con el objetivo de ampliar el estudio, se incluyeron además plantas de otras zonas vitivinícolas españolas (Extremadura, Alicante y Rioja Alavesa) que fueron analizadas en nuestro laboratorio (Tabla 3.2.4).

Tabla 3.2.4. Datos de las plantas de vid cultivadas en otras regiones vitivinícolas de España y analizadas en nuestro laboratorio. TP: Tempranillo. ¹: Entre paréntesis se indica el número de aislados de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Pal: *Phaeoacremonium aleophilum*; Pch: *Phaeomoniella chlamydospora*; Botry: Botryosphaeriaceae; Cyl: *Cylindrocarpon* spp.; Fme: *Fomitiporia mediterranea*; Pir: *Phaeoacremonium iranianaum*.; Shi: *Stereum hirsutum*.

Código planta	Origen Geográfico	Variedad	Edad	Síntomas	Aislados fúngicos ¹
Y104	Extremadura	nd/TP	1	Petri	Pal (1)
Y108	Extremadura	nd/TP	1	Petri	Pal (1) Botry (1)
Y110	Extremadura	nd/TP	1	Petri	Pal (1)
Y161	Alicante	nd/nd	> 15	yesca	Pal (3) Pch (8) Botry (6)
Y168	Alicante	nd/nd	> 15	yesca	Pal (1) Cyl (1) Pch (1) Botry (13) Fme (1)
Y277	Rioja Alavesa	nd/TP	50-60	yesca	Pir (1) Botry (1) Shi (1)

3.2.1.2. Aislados de *Phaeoacremonium*

Inicialmente cada uno de los hongos identificados a partir de una astilla fue considerado un aislado. Para evaluar la variabilidad de un aislado se crecieron individualmente tres o más esporas generando cada una de ellas un cultivo monospórico. Todos los ensayos de caracterización fueron realizados con cultivos monospóricos, identificados por nombres que se diferencian entre ellos por la última letra minúscula (Tabla 3.2.5) con la única excepción de los aislados Y270-16-1 e Y277-14-1 para los que no fue posible germinar esporas.

La Tabla 3.2.5 enumera todos los aislados y cultivos monospóricos utilizados en esta investigación. Se muestra también el código de la planta de procedencia que permite asociar cada aislado fúngico con las características de la vid infectada y los análisis o ensayos a los que fue sometido cada uno de los aislados y/o monospóricos.

Adicionalmente se incluyeron en el trabajo seis monospóricos de cultivos tipo, adquiridos directamente del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS fungal collection, Utrecht, The Netherlands), y correspondientes a cinco especies del género: *Phaeoacremonium scolyti* (CBS113593), *Pm. viticola* (CBS113065), *Pm. parasiticum* (CBS113585), *Pm. inflatipes* (CBS222.95) y *Pm. aleophilum* (CBS631.94). Así como cuatro cultivos monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* procedentes de aislados donados por diferentes grupos de trabajo y con origen en Madrid, Valencia y Cádiz (Tabla 3.2.5).

Tabla 3.2.5. Listado de aislados de aislados de *Phaeoacremonium* seleccionados para desarrollar los ensayos de caracterización molecular y fenotípica. R: RAPD; A: AFLP; S: Secuenciación; M: Análisis morfológico o fenotípico. ¹: Aislados procedentes de la colección del CBS. ³: Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, INIA (Madrid). ⁴: Aislados cedidos por el Dr. P. García Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Aldearrubia (Salamanca). ⁵: Aislado cedido por el Dr. J. García Jiménez, Universidad Politécnica de Valencia (Valencia). ⁶: Aislado cedido por D. J. Parra del servicio de Sanidad Vegetal de Jerez de la Frontera (Cádiz).

Código planta	Aislados	Zona de aislamiento	Cultivos monospóricos	Ensayos			
				R	A	S	M
S001	S001-04-2 ⁴	inserción raíz	S001-04-2a	R	-	S	M
S004	S004-03-1 ⁴	portainjerto	S004-03-1a	R	-	S	-
S016	S016-03-1 ⁴	portainjerto	S016-03-1a	R	A	S	M
Y038	Y038-05-3	nd	Y038-05-3a	R	A	S	M
			Y038-05-3z	R	A	S	M
Y069	Y069-06-1	variedad	Y069-06-1c	R	A	S	M
Y082	Y082-02-5	variedad	Y082-02-5a	R	A	S	M
			Y082-02-5z	R	-	S	M
Y085	Y085-09-1	variedad	Y085-09-1b	R	-	S	M
			Y085-15-1a	R	-	-	M
			Y085-15-1b	R	A	S	M
			Y085-15-2z	R	-	S	M
Y086	Y086-15-1	variedad	Y086-15-1a	R	A	S	M
			Y086-15-1b	R	-	-	M
			Y086-15-1x	R	A	S	M
Y104	Y104-06-1	portainjerto	Y104-06-1b	R	A	S	M
Y108	Y108-02-2	inserción raíz	Y108-02-2a	R	-	S	M
			Y108-02-2z	R	A	S	M
Y110	Y110-07-1	zona de injerto	Y110-07-1c	R	-	S	-
Y161	Y161-19-2	portainjerto	Y161-19-2a	R	-	S	M
			Y161-19-2z	R	-	S	M
Y168	Y168-14-2	variedad	Y168-14-2a	R	A	S	M
			Y168-14-2b	R	-	-	M
Y182	Y182-01-1	variedad	Y182-01-1a	R	-	S	M
			Y182-01-1b	R	-	-	M
Y233	Y233-05-4	variedad	Y233-05-4a	R	A	S	M
			Y233-05-4b	R	-	-	M
Y235	Y235-04-1	variedad	Y235-04-1a	R	-	S	M
			Y235-04-1b	R	-	-	M
			Y235-04-1w	R	-	S	M
Y270	Y270-16-1	variedad	-	-	S	-	
Y271	Y271-03-1	inserción raíz	Y271-03-1d	-	-	S	M
Y277	Y277-14-1	variedad	-	-	S	-	
Y549	Y549-09-3	portainjerto	Y549-09-3b	-	-	S	M
AISLADOS DE REFERENCIA ADQUIRIDOS O CEDIDOS							
Especie	Aislados	Origen	Cultivos monospóricos	Ensayos			
				R	A	S	M
<i>Pm. aleophilum</i>	INIA ³	Madrid	INIA_b	R	A	S	M
	Jerez ⁶	Jerez de la Frontera	Jerez_a	R	A	S	M
			Jerez_c	R	A	S	M
	CLM51.6 ⁵	Valencia	CLM51.6a	R	A	S	M
	CBS631.94 ¹	Italia	CBS631.94a	R	-	S	M
Pal15b			R	A	S	M	
<i>Pm. viticola</i>	CBS113065 ¹	Sudáfrica	CBS113065a	R	-	S	M
<i>Pm. parasiticum</i>	CBS113585 ¹	Sudáfrica	CBS113585a	R	-	S	M
<i>Pm. scolyti</i>	CBS113593 ¹	Francia	CBS113593b	R	-	S	M
<i>Pm. inflatipes</i>	CBS222.95 ¹	USA	CBS222.95b	R	-	S	-
TOTAL	30	-	42	40	17	38	39

i. Técnica RAPD

El máximo número de monospóricos fue empleado para realizar el ensayo con marcadores de tipo RAPD. En total se amplificó el ADN de 40 monospóricos que se indican con la letra **R** en la Tabla 3.2.5.

ii. Técnica AFLP

Para el análisis de marcadores moleculares de tipo AFLP se seleccionaron 17 de los 40 monospóricos descritos para realizar el análisis por RAPD, los cuáles fueron también empleados en la caracterización morfológica y la secuenciación de varias regiones genómicas. Los 17 monospóricos analizados mediante AFLP han sido diferenciados con la letra **A** en la Tabla 3.2.5.

iii. Secuenciación parcial de genes

En el estudio de la variabilidad genética desarrollado en base a la amplificación de secuencias genómicas parciales se incluyeron 36 cultivos monospóricos y dos aislados. Un total de 34 monospóricos coinciden con los analizados mediante RAPD, incluyendo los aislados tipo del CBS. Se estudiaron además los monospóricos Y271-03-1d e Y549-09-3b, y los aislados Y270-16-1 e Y277-14-1 que fueron recogidos e identificados con posterioridad a la finalización del ensayo de RAPD y AFLP. Todos los aislados y/o monospóricos cuyo genoma ha sido parcialmente secuenciado en este trabajo se diferencian con la letra **S** en la Tabla 3.2.5.

iv. Caracterización morfológica y fenotípica

En el ensayo fenotípico se recogieron datos de un total de 39 cultivos monospóricos. Todos ellos incluidos en el análisis por RAPD, excepto Y271-03-1d e Y549-09-3b. La dilatación en el tiempo entre los dos tipos de estudios provocó además que los monospóricos Y110-07-1c y S004-03-1a no pudieran ser recuperados de la colección y cultivados en medio PDA, siendo imposible su caracterización morfológica. Finalmente se desestimó incluir el aislado *Pm. inflatipes* (CBS222.95) en la caracterización fenotípica por conocerse los resultados obtenidos en la caracterización molecular realizada previamente.

Los 39 monospóricos caracterizados fenotípicamente se indican con la letra **M** en la Tabla 3.2.5.

3.2.2. Caracterización molecular mediante la técnica RAPD

3.2.2.1. Extracción y purificación de ADN

El ADN genómico de todos los aislados se obtuvo a partir de micelio liofilizado mantenido a -20°C y pulverizado con ayuda de un molino vibratorio siguiendo las condiciones previamente descritas en el apartado 2.2.1.2 (Capítulo 2). Todas las extracciones se realizaron por duplicado partiendo de dos replicas de micelio liofilizado para cada uno de los monospóricos estudiados.

3.2.2.2. Selección de oligonucleótidos iniciadores

Se probaron un total de 20 iniciadores pertenecientes a cinco series diferentes (OPA, OPC, OPD, OPE y OPO) de la colección OPERON (Operon technologies, La Jolla, California, USA). La amplificación selectiva se llevó a cabo con ADN de nueve aislados: se comparó el patrón de dos monospóricos (procedentes de un mismo aislado) para comprobar la homogeneidad de cuatro aislados distintos y también se incluyó el ADN de una población para determinar si la reproducibilidad de un aislado no monospórico era menor. Los iniciadores que mostraron patrones con un número de bandas fácilmente distinguibles, de intensidad uniforme y altamente reproducibles fueron seleccionados. Finalmente se eligieron doce de los 20 iniciadores probados (Tabla 3.2.6).

Tabla 3.2.6. Número de iniciadores OPERON de cada serie que han sido probados y seleccionados para el análisis RAPD.

NOMBRE SERIE	NÚMERO INICIADORES PROBADOS	INICIADORES SELECCIONADOS
Serie OPA	6	OPA2, OPA 8, OPA16, OPA11
Serie OPC	3	OPC 8
Serie OPD	4	OPD2, OPD 8, OPD 16
Serie OPE	6	OPE3, OPE19, OPE20
Serie OPO	1	OPO 15
Total 5	20	12

3.2.2.3. Condiciones de amplificación

En las reacciones de amplificación se utilizó el preparado Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Buckinghamshire, UK) y un termociclador Gene Amp® 7200 (Applied Biosystems) siguiendo los materiales y métodos detallados en el apartado 2.2.2.1 del Capítulo 2. La amplificación de cada monospórico fue repetida un mínimo de dos veces y se incluyó una reacción sin ADN molde como control negativo. El volumen total de la reacción fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en TAE 1x de acuerdo con lo anteriormente descrito en el apartado 2.2.2.1 (Capítulo 2).

3.2.2.4. Análisis de datos

El análisis de los marcadores RAPDs se realizó teniendo en cuenta las bandas reproducibles e intensas que presentaron variabilidad. El tamaño de las bandas generadas en los perfiles RAPD para cada aislado se estableció visualmente. Se escogieron bandas intensas de tamaños comprendidos entre 2600 y 300 pb, que a su vez fueron reproducidas en las dos o tres repeticiones realizadas. Todos los marcadores fueron puntuados asignándose 1 a la presencia de banda y 0 a la ausencia para cada uno de los aislados monospóricos analizados. A partir de los datos binarios se realizó un fingerprinting y un análisis estadístico de bandas.

i. Análisis inter-específico

Con el conjunto de datos generado de los 40 monospóricos se calcularon los valores de semejanza genética según la ecuación matemática propuesta por Nei y Li (1979), basada en la proporción de bandas de ADN compartidas. El coeficiente de similitud (S) para cada par de monospóricos se calculó utilizando la siguiente fórmula: $S = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$, donde: n_{xy} es el número de bandas compartidos entre dos monospóricos; n_x es el número total de bandas para el monospórico x y n_y es el número total de bandas para el monospórico y . El programa “TREECON for Windows” (versión 1.3b) (Van de Peer & De Wachter, 1994), se empleó para crear un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean) con 1000 remuestreos.

ii. Análisis intra-específico

A continuación se analizó la variabilidad genética intra-específica, tomando los datos únicamente de todos los monospóricos de *Pm. aleophilum* (N = 36). Se construyeron dos matrices de identidad o similitud: la primera basada en el índice de identidad de Jaccard (IJ_{xy}), siguiendo la Fórmula 2.2.1 (Jaccard, 1908) y la segunda basada en la proporción normalizada de bandas compartidas (Q_{xy}) para RAPD, siguiendo la Fórmula 2.2.3 (Nei & Takezaki, 1994; Nei & Kumar, 2000) (ver Capítulo 2, apartado 2.2.1.4).

Las similitudes sirvieron para la elaboración de dendogramas utilizando el método de Neighbour-Joining, una vez convertidas en distancias como $I-IJ_{xy}$ y $I-Q_{xy}$ respectivamente. Adicionalmente se desarrolló un remuestreo con 100 réplicas para determinar el soporte de la topología y los grupos diferenciados en el dendograma. De modo que finalmente se obtuvieron dos dendogramas que pudieron ser visualmente comparados. Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con el soporte informático TULKAS diseñado por Sáenz de Miera (Sin publicar). Por último la distancia genética resultante de ambos cálculos fue comparada y evaluada mediante el test de Mantel (Mantel, 1967).

iii. Diversidad genética

Los monospóricos con un mismo patrón de RAPD se consideraron como un único haplotipo distinguible del resto. La diversidad genética intra-específica de *Pm. aleophilum* (G/N) fue calculada como el número de haplotipos distintos (G) dividido entre el número total de monospóricos analizados (N = 36). Se calculó también el índice de Shannon (H') (Shannon & Weaver, 1949) como $H' = \sum_{pi} \ln pi$, donde pi es la frecuencia del haplotipo i th; y el índice de Shannon normalizado (H) para corregir las diferencias derivadas del tamaño de la muestra utilizando la expresión: $H = H' (\ln N)^{-1}$, donde N es el tamaño muestral (para RAPD N = 36), propuesta por Borie *et al.*, (2002).

iv. Análisis de agrupamiento

Para confirmar los grupos de haplotipos obtenidos con el análisis Neighbor-Joining de las distancias genéticas se emplearon dos métodos de agrupamiento.

Primero, los haplotipos fueron agrupados mediante un método de análisis Bayesiano utilizando el programa Structure v2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Este método ha sido descrito para analizar datos genotípicos de múltiples locus y permite inferir la estructura de una población asignando individuos (monospóricos en este caso) a un número K de grupos o sub-poblaciones. Los individuos de una muestra son asignados de forma probabilística a un grupo (o varios cuando sus haplotipos indican que son una mezcla o haplotipos intermedios). Cada grupo es caracterizado por las frecuencias de los alelos de cada loci incluido en el análisis (Pritchard *et al.*, 2000). Se probaron múltiples valores de K (de 1 a 7). Para verificar la consistencia de las estimaciones, el análisis fue repetido 10 veces para cada uno de los valores de K probados. El número de grupos (K) que mejor se ajustaba a los resultados obtenidos fue decidido en base a la mayor probabilidad del modelo K (calculada como el $\ln \Pr(X/K)$, donde X representa el total de los datos). Este método no asume un proceso de mutación particular, puede ser aplicado a la mayoría de los marcadores moleculares -como RAPD o AFLP- (Pritchard *et al.*, 2000) y ha sido utilizado con éxito en el análisis de otros hongos patógenos de vid (Comont *et al.*, 2010).

En segundo lugar, se realizó un análisis multivariante de tipo PCA (Análisis de Componentes Principales) utilizando el procedimiento disponible en el paquete R, desarrollado por el “R Development Core Team” (2008), de la Fundación R para el Cómputo Estadístico, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. *R: A language and environment for statistical computing*. La principal ventaja del análisis PCA sobre otros métodos como el análisis Bayesiano realizado con el Structure v2.2 es que no asume ningún determinado modelo genético (Falush *et al.*, 2003).

3.2.3. Caracterización molecular mediante la técnica AFLP

La metodología seguida para obtener marcadores moleculares de tipo AFLP utilizando 17 monospóricos de *Pm. aleophilum* ha sido descrita previamente en los apartados 2.2.1.2 y 2.2.1.3 de material y métodos del Capítulo 2.

Para el análisis de los resultados se utilizó el software específico GeneMarker (apartado 2.2.1.4, Capítulo 2) y todos los fragmentos amplificados comprendidos entre 60 pb y 455 pb fueron verificados manualmente. Los marcadores AFLPs reproducibles se transformaron en datos binarios (1 = presencia, 0 = ausencia) y fueron sometidos al mismo tipo de análisis intra-específico descrito anteriormente para RAPD (apartado 3.2.2.5, *ii. Análisis intra-específico*) construyendo dos dendogramas. Se estimó la correlación entre las distancias genéticas, estimadas como $1-IJ_{xy}$ y $1-Q_{xy}$. Los resultados obtenidos con la técnica RAPD y AFLP fueron comparados mediante el test de Mantel (Mantel, 1976).

La diversidad genética intra-específica de *Pm. aleophilum* fue calculada como G/N (con $N = 17$ para AFLP). También se estimó el índice de Shanon (H') y el índice de Shanon normalizado (H), siguiendo la metodología descrita anteriormente para los marcadores RAPDs (apartado 3.2.2.5, *iii. Diversidad genética*). Los resultados de diversidad genética obtenidos mediante RAPD y AFLP fueron comparados.

La estructura genética de la población de *Pm. aleophilum* analizada con la técnica AFLP fue sometida a los dos tipos de análisis de agrupamiento descritos anteriormente para los resultados de la técnica RAPD (Bayesiano y PCA; ver apartado 3.2.2.5, *iv. Análisis de agrupamiento*). Pero, en este caso, el número de grupos (K) probados en el programa Structure v2.2 fue de 1 a 4.

3.2.4. Caracterización molecular mediante análisis de secuencias

3.2.4.1. Extracción de ADN

Para realizar la amplificación por PCR las extracciones de ADN genómico se realizaron siguiendo dos métodos diferentes en función de las condiciones de amplificación.

Siempre que la reacción de PCR se realizó con el kit comercial REDEExtract-N-Amp (XNAP) (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) (región ITS, β -tubulina y FE1- α), el ADN genómico fue obtenido a partir de micelio fresco y esporas. Para ello se crecieron colonias en placas Petri con medio PDA durante tres semanas a 25°C y en oscuridad. Posteriormente se raspó el micelio mecánicamente con una punta esterilizada y se siguieron las instrucciones del proveedor para el citado kit comercial.

Para las reacciones de PCR de los genes actina y calmodulina se emplearon diluciones de 10 ng/ μ l de ADN purificado obtenidas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1.2 (Capítulo 2).

3.2.4.2. Amplificación de ADN mediante PCR

En total se amplificaron seis regiones genómicas mediante PCR para estudiar la variabilidad genética existente entre los 38 aislados de *Phaeoacremonium* estudiados. Todos los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por la firma comercial IZASA (Barcelona, España) y las amplificaciones se desarrollaron en los termocicladores Gene Amp[®] 7200 y/o Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

i. Región ITS

La primera región amplificada fue una secuencia que contenía parcialmente el gen 18S, la región completa de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 así como el gen 5,8S, y una región parcial del gen 28S que codifica para el ARNr, con la pareja de oligonucleótidos universales ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La localización esquemática de los oligonucleótidos en la unidad de ADNr, los reactivos empleados en la reacción y las condiciones de amplificación han sido previamente descritos en el Capítulo 1 de esta memoria (Figura 1.2.1. A, apartado 1.2.5.2 y Tabla 1.2.2).

ii. β -tubulina

Para el estudio del gen de la β -tubulina se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación por PCR diferentes:

La región comprendida entre el exón 1 y el inicio del exón 6 fue amplificada utilizando los oligonucleótidos universales T1 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) y Bt2b (Glass & Donaldson, 1995).

Un segundo fragmento del gen de la β -tubulina fue amplificado con los oligonucleótidos universales Bt1a y Bt1b (Glass & Donaldson, 1995). Esta región comprende la parte final del exón 6 y la inicial del exón 7.

La Figura 1.2.1. B del Capítulo 1 muestra la localización de los cuatro oligonucleótidos citados anteriormente en el gen de la β -tubulina. La mezcla de cada reacción y las condiciones de amplificación también han sido previamente detalladas en el apartado 1.2.5.2 y la Tabla 1.2.2 del Capítulo 1.

iii. Actina

La amplificación de una parte del gen de la actina (exones 1 a 3) fue la cuarta región genómica comparada y se realizó utilizando los oligonucleótidos iniciadores ACT-512F y ACT-783R (Carbone & Kohn, 1999) (Figura 3.2.1. A).

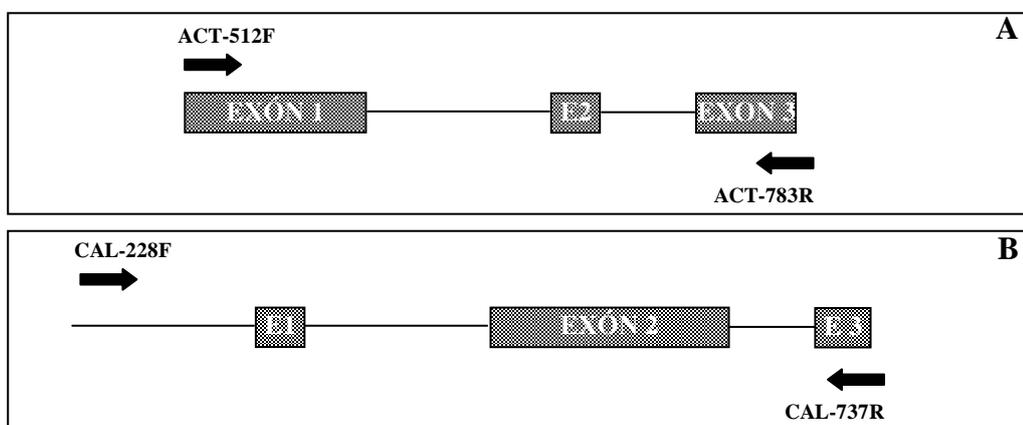


Figura 3.2.1. A: Representación esquemática de la región parcial del gen de la actina y localización del par de oligonucleótidos ACT-512F y ACT-783R empleados en la caracterización de *Phaeoacremonium*. B: Representación esquemática de la región parcial del gen de la calmodulina y localización del par de oligonucleótidos CAL-228F y CAL-737R empleados en la en la caracterización de *Phaeoacremonium*.

La mezcla de reacción contenía 1x de tampón, MgCl_2 2 mM, 200 μM de cada uno de los dNTPs, 0,1 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools Biotechnological and Medical Laboratories SA, Madrid, Spain) y 2 μl de la dilución de ADN purificado. La mezcla se ajustó

con agua MiliQ estéril hasta un volumen final de 25 µl que fue posteriormente cuadruplicado para conseguir cantidad suficiente del fragmento amplificado. La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.2.7.

iv. Calmodulina

La quinta región parcial estudiada fueron los exones de 1 al 3 del gen de la calmodulina (Figura 3.2.1). La reacción se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos CAL-228F y CAL-737R como iniciadores (Carbone & Kohn, 1999). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 25 µl utilizando los mismos reactivos y concentraciones detallados anteriormente para el gen de la actina. La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.2.7.

Tabla 3.2.7. Secuencias de los oligonucleótidos universales y condiciones empleadas para amplificar por PCR parte de los genes de la actina y la calmodulina en *Phaeoacremonium spp.*

REGIÓN TAMAÑO (pb)	SECUENCIA CEBADORES (5' → 3')	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN
Actina (~250)	ACT-512F ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	<p>X 35 ciclos</p>
	ACT-783R TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
Calmodulina (~500)	CAL-228F GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	<p>X 35 ciclos</p>
	CAL-737R CATCTTCTGGCCATCATGG	

v. Factor de Elongación 1-α (EF1-α)

Finalmente, para la amplificación de una parte del gen EF1-α se recurrió a los oligonucleótidos iniciadores EFE-2F y EFE-3R (Cobos & Martín, 2008), que amplifican parcialmente el exón 2 y el exón 3 (Figura 1.2.1. C, Capítulo 1). Los reactivos empleados en la reacción y las condiciones de amplificación han sido previamente descritos en el Capítulo 1 de esta memoria (apartado 1.2.5.2 y Tabla 1.2.2).

3.2.4.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa cargando una alícuota de 5 μ l de cada producto de PCR y fueron visualizados según lo descrito en el apartado 1.2.5.3 del Capítulo 1.

3.2.4.4. Purificación y secuenciación

Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente fueron secuenciados en ambas direcciones por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León mediante DYEnamic ET Dye terminator Kit (MegaBACE, Amersham) en un termociclador MJ Research PTC-200. Esta información ha sido más detallada en los apartados 1.2.5.4 y 1.2.5.5 del Capítulo 1.

3.2.4.5. Análisis de datos

i. Edición de las secuencias obtenidas

Las secuencias sentido y antisentido fueron leídas con el programa Chromas v1.45 y, posteriormente se creó una secuencia consenso de cada región para cada uno de los aislados y/o monospóricos analizados. Todas las secuencias consenso fueron sometidas a un análisis BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

ii. Alineamientos

Se construyó un alineamiento de las secuencias de todos los *Phaeoacremonium* analizados para cada una de las seis regiones del genoma amplificadas. Los alineamientos se realizaron con CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>1.83) y fueron modificados manualmente cuando fue necesario con ayuda del programa MEGA v.5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2011). Para el estudio de la variabilidad genética se anotaron todas las diferencias observadas

en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos dentro de cada uno de los seis alineamientos obtenidos.

iii. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos de los datos alineados se realizaron utilizando los métodos Neighbor-Joining (NJ) y Máxima Verosimilitud (ML). Todos los análisis se realizaron con la ayuda del programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

Se construyó un árbol filogenético de cada uno de los seis fragmentos amplificados utilizando el método NJ. Para ello se calcularon las distancias genéticas con el modelo 2-parámetros de Kimura, que asume que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma y que la tasa de sustitución no varía entre sitios (Kimura, 1980). En todos los casos se efectuó un análisis de “bootstrap” de 1000 repeticiones. Para realizar este tipo de reconstrucción filogenética se recopilaron secuencias del GenBank (National Center for Biotechnology Information; enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), lo que permitió ampliar el estudio de variabilidad genética (Tabla 3.2.8).

En el análisis de la región ITS se incluyeron 11 secuencias de *Phaeoacremonium* depositadas previamente en el GenBank (Tabla 3.2.8). Como outgroup se utilizó la secuencia EU018412 del aislado Y83-8-1 de *Phaeomoniella chlamydospora* (Cobos & Martín, 2008).

En la construcción del árbol filogenético con las secuencias parciales del gen de la β -tubulina, obtenidas con los oligonucleótidos T1 y Bt2b, se incluyeron 20 secuencias del GenBank (Tabla 3.2.8). La secuencia AY579334 de *Pleurostomophora richardsiae* (Mostert *et al.*, 2005) fue utilizada como outgroup de esta región.

En el análisis del gen codificante para la actina se emplearon 20 secuencias obtenidas del GenBank (Tabla 3.2.8) y como outgroup se recurrió a la secuencia AY579271 de *Pleurostomophora richardsiae* (Mostert *et al.*, 2005).

El número de secuencias del gen de la calmodulina disponible en la base de datos fue reducido (19). Solamente dos secuencias del GenBank (Tabla

3.2.8) fueron incluidas en el análisis NJ de esta región. Como outgroup se utilizó la secuencia AY745036 de *Phomopsis viticola*.

Tabla 3.2.8. Secuencias obtenidas de la base de datos GenBank e incluidas en el análisis filogenético utilizando el método Neighbor-Joining. ^a: Publicaciones consultadas. 1. Groenewald *et al.*, 2001; 2. Mostert *et al.*, 2006; 3. Tegli *et al.*, 2000; 4. Prodi *et al.*, 2008; 5. Essakhi *et al.* 2008; 6. Damm *et al.*, 2008; 7. Dupont *et al.*, 2000; 8. Mostert *et al.*, 2005; 9. Gramaje *et al.*, 2009; 10. Mostert *et al.*, 2003. *: El aislado CBS100400 fue descrito como *Pm. aleophilum* por Groenewald *et al.*, 2001 y Mostert *et al.*, 2003, sin embargo en 2006 fue reclasificado como *Pm. iranianum* por Mostert *et al.* (2006), en base a las secuencias de la β -tubulina y la actina.

Especie Aislado	Número de acceso GenBank				Publicación ^a
	ITS	B-tubulina (T1-Bt2b)	Actina	Calmodulina	
<i>Pm. aleophilum</i>					
CBS100400*	AF197992 ⁽¹⁾ AY179941 ⁽¹⁰⁾	-	-	-	(1), (10)
CBS631.94	AF266647	-	-	-	(3)
Strain 30	DQ404355	-	-	-	(4)
132Pal	-	EU863472	EU863504	-	(5)
CBS110703	-	DQ173094	DQ173115	-	(2)
168Pal	-	EU863466	EU863498	-	(5)
<i>Pm. iranianum</i>					
STE-U6091	EU128030	EU128078	EU128120	-	(6)
7Pal	-	EU863462	EU863494	-	(5)
CBS100400*	-	DQ173096 ⁽²⁾	DQ173119 ⁽²⁾	-	(2)
<i>Pm. viticola</i>					
LCP933886	AF118137	-	-	-	(7)
CBS101737	-	AF246817 ⁽¹⁾	DQ173129 ⁽²⁾	-	(1), (2)
CBS113065	-	DQ173105	DQ173128	-	(2)
<i>Pm. mortioniae</i>					
Strain 69	EU427312	-	-	-	(4)
CBS110212	-	DQ173109	DQ173136	-	(2)
111Pal	-	EU863477	EU863509	-	(5)
CBS211.97	-	AF246810 ⁽¹⁾	DQ173138 ⁽²⁾	-	(1), (2)
<i>Pm. inflatipes</i>					
CBS391.71	AF197990 ⁽¹⁾	AF246805 ⁽¹⁾	AY579259 ⁽⁸⁾	AY579290 ⁽⁸⁾	(1), (8)
CBS222.95	AF266655	-	-	-	(3)
CBS166.75	-	AY579322	AY579258	-	(8)
<i>Pm. hispanicum</i>					
Pm8	-	FJ517164	FJ517156	-	(9)
<i>Pm. parasiticum</i>					
CBS101007	AF197980 ⁽¹⁾	AF246804 ⁽¹⁾	AY579252 ⁽⁸⁾	-	(1), (8)
CBS113585	-	AY579307	AY579241	-	(8)
40ss2Pal	-	EU863487	EU863519	-	(5)
<i>Pm. scolyti</i>					
STE-U5955	EU128034	EU128082	EU128124	-	(6)
CBS113593	-	AY579293	AY579225	AY579275	(8)
109Pal	-	EU863486	EU863518	-	(5)
TOTAL SECUENCIAS	11	20	20	2	

En el presente trabajo, se ha secuenciado por primera vez la región de la β -tubulina que comprende parcialmente los exones 6 a 7 en aislados de *Phaeoacremonium*. Por ello, no existían secuencias de esta región para especies del género estudiado en la base de datos GenBank. Como outgroup se incluyeron las secuencias EF445665 y EF445660 de *Cylindrocarpon liriodendri* y *Neonectria macrodydima*, respectivamente (Alaniz *et al.*, 2007).

El gen codificante para el FE1- α ha sido poco estudiado en el género *Phaeoacremonium*. Se encontraron algunas secuencias de esta región en la base de datos (Mostert *et al.*, 2003) obtenidas con los oligonucleótidos EF1-728F y EF1-986R (Carbone & Kohn, 1999). Pero no fueron incluidas en el análisis filogenético por su reducida longitud. Como outgroup se utilizó la secuencia EU158820 del aislado Y83-8-1 de *Phaeomoniella chlamydospora* (Cobos & Martín, 2008).

Finalmente se realizó un análisis filogenético con la secuencia concatenada de las seis regiones amplificadas utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) y el mejor modelo evolutivo. Se realizó un análisis del conjunto de datos, eliminando los espacios y datos perdidos, para determinar el modelo evolutivo más apropiado. La versión 5.05 del programa MEGA permitió seleccionar el modelo que mejor describía el patrón de sustitución de los nucleótidos del conjunto de datos, de acuerdo con el mínimo valor de BIC (*Bayesian Information Criterion*). Se llevó a cabo un remuestreo con 1000 repeticiones para determinar el soporte de la topología y los grupos diferenciados en el árbol filogenético.

iv. Análisis intra-específico de Pm. aleophilum

Para visualizar la variabilidad intra-específica total observada entre los 30 cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados se generó un diagrama de redes con el soporte del programa Network 4.6.0.0 de Fluxus Technology (<http://www.fluxus-engineering.com>) (Bandelt *et al.*, 1995 y 1999). Para ello todas las diferencias observadas en las secuencias de nucleótidos fueron transformadas en datos binarios (1 = presencia de un determinado nucleótido; 0 = presencia de otro nucleótido distinto). Las deleciones de uno o dos nucleótidos también fueron incluidas como una única diferencia.

La diversidad genética intra-específica de *Pm. aleophilum* fue calculada como G/N (con $N = 30$ para el análisis de secuencias). También se estimó el índice de Shanon (H') y el índice de Shanon normalizado (H), siguiendo la metodología descrita para los marcadores RAPDs (apartado 3.2.2.4, *iii. Diversidad genética*). Los resultados obtenidos fueron comparados con los proporcionados por el análisis de marcadores moleculares.

Utilizando la matriz de datos binarios se calcularon dos matrices de distancia estimadas como $1-IJ_{xy}$ y $1-Q_{xy}$, respectivamente. Este cálculo sirvió para comparar mediante el test de Mantel (Mantel, 1976) los resultados obtenidos por secuenciación de múltiples genes con las técnicas RAPD y AFLP. Las matrices fueron creadas con ayuda del programa informático TULKAS siguiendo la metodología descrita anteriormente para RAPD (apartado 3.2.2.4, *ii. Análisis intra-específico*). [ver Fórmula 2.2.1 (IJ_{xy}) y Fórmula 2.2.3 (Q_{xy}) del apartado 2.2.1.4 en el Capítulo 2].

3.2.5. Caracterización morfológica y fenotípica

La caracterización morfológica de los aislados de *Phaeoacremonium* fue realizada en medio PDA. Todos los aislados y/o monospóricos se crecieron a 25 °C en oscuridad y por triplicado.

En primer lugar se observaron la textura y coloración del micelio después de cuatro semanas de crecimiento. Así como la producción de pigmentación amarilla en el medio de cultivo tras tres semanas de incubación (presencia/ausencia). El ensayo fue repetido dos veces.

Además se cuantificaron los siguientes parámetros: tasa de crecimiento, capacidad de esporulación, longitud (L) y anchura (W) de los conidios, relación L/W y color del reverso de la colonia. Para cada uno de éstos parámetros, las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada especie o grupos intra-específicos (para *Pm. aleophilum*) fueron establecidas mediante un análisis de la varianza ANOVA aplicando el test LSD (Diferencia Mínima Significativa) con un p -valor $\leq 0,05$. Para realizar este análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics, Inc. Pockville, MD, USA).

3.2.5.1. Tasa de crecimiento

Se sembraron cuadros de agar de 4 mm procedentes del margen exterior de un cultivo de 14 días en el centro de tres placas de medio PDA. El radio de crecimiento se calculó después de dos semanas de incubación. Para tomar la medida se trazaron dos ejes perpendiculares en el reverso de la placa. Los datos se expresaron como el crecimiento medio radial en milímetros. El experimento se repitió dos veces.

3.2.5.2. Capacidad de esporulación

La cantidad de conidios producidos fue evaluada tras dos semanas de crecimiento, después de sembrar cuadros de agar de 4 mm procedentes del margen exterior de un cultivo de 14 días en el centro de tres placas de medio PDA. Las esporas producidas fueron recogidas y cuantificadas según lo descrito en el apartado 2.2.3.4 del Capítulo 2 (ii. *Esporas fúngicas*). Los datos se expresaron como el \log_{10} de conidios producidos por ml. El experimento se repitió dos veces.

3.2.5.3. Dimensión de los conidios

La longitud y anchura de 10 conidios de cada aislado fue medido con la ayuda de un microscopio óptico (Nikon 501-DSIF1) a 400 aumentos. Se calcularon los valores medios de longitud (L) y anchura (W) resultante de las 10 medidas tomadas en μm y la relación L/W.

3.2.5.4. Color del reverso de la colonia

Para medir el color se empleó un colorímetro Minolta[®] CHROMA METER CR 400 (Minolta, Carrières sur Seine, Francia) que proporciona una lectura directa en el sistema de coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ * donde: L = luminosidad, a = amarillo-azul, b = rojo-verde. Los datos se estimaron después de cuatro semanas de crecimiento. En la base de cada placa Petri se tomarán 3 medidas posicionando el colorímetro a 1 cm desde el margen de crecimiento hacia el centro. El ensayo fue repetido dos veces.

3.2.5.5. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

Los datos fenotípicos de *Pm. aleophilum* fueron explorados mediante un análisis multivariante de componentes principales (PCA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics, Inc. Pockville, MD, USA). Las variables incluidas en este análisis fueron la tasa de crecimiento, el \log_{10} de los conidios producidos por ml, la longitud, anchura y relación L/W de los conidios, el color reverso de la colonia ($L^* a^* b^*$) y la tinción amarilla del medio PDA.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterización molecular mediante la técnica RAPD

Como resultado del análisis por RAPD se obtuvieron 131 bandas intensas y reproducibles de tamaño comprendido entre 320 y 2780 pb, aproximadamente. El número de bandas obtenidas por reacción fue variable y osciló entre un máximo de 16 con los iniciadores OPE20 y OPE2, y seis bandas con OPA8. El número medio de bandas consideradas por iniciador fue de aproximadamente 11 bandas (Tabla 3.3.1).

Tabla 3.3.1. Número de marcadores RAPDs obtenidas con cada iniciador ensayado. La expresión de la media va seguida del error estándar.

Iniciador	Nº de bandas valoradas
OPA2	14
OPA8	6
OPA11	11
OPA16	7
OPC8	10
OPD2	16
OPD8	12
OPD16	9
OPE3	8
OPE19	12
OPE20	16
OPO15	10
Total	131
Media	10,9±0,9

Los patrones de bandas obtenidos fueron constantes y reproducibles entre las dos replicas de ADN extraído por monospórico (Figura 3.3.1).

Del mismo modo las reacciones de amplificación realizadas en días diferentes con las mismas muestras de ADN presentaron una elevada reproducibilidad (Figura 3.3.2).

Incluso, a pesar de la baja reproducibilidad entre laboratorios atribuida a esta técnica, en este trabajo se observaron bandas descritas previamente por otros autores: OPA8-2780, OPO15-850 (Figura 3.3.1) y OPO15-540 descritas por Péros *et al.*, (2000) y Borie *et al.*, (2002).

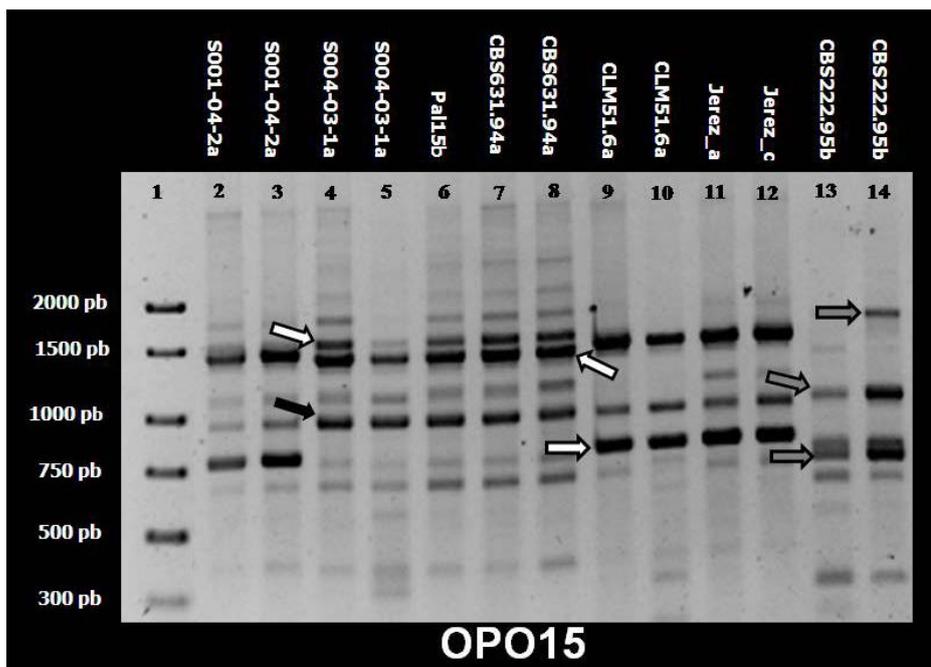


Figura 3.3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificados con el iniciador OPO15. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2 a 12: monospóricos de *Pm. aleophilum*. Carriles 13 y 14: *Pm. inflatipes* del CBS. La flecha negra indica una banda monomórfica de *Pm. aleophilum*. Las flechas blancas indican bandas polimórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas grises indican bandas observadas en otras especies del género.

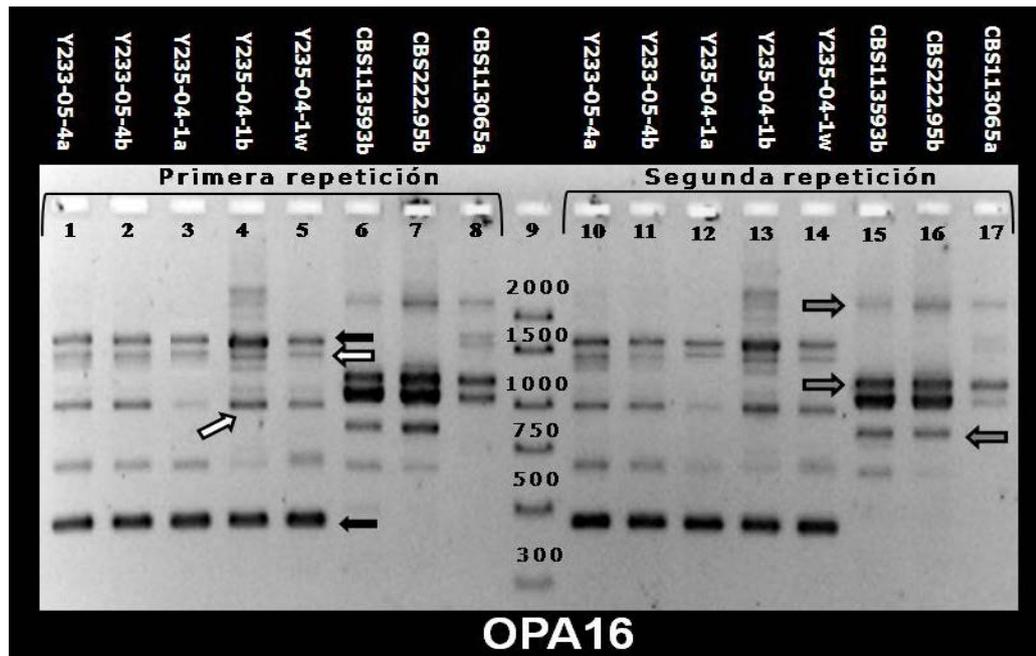


Figura 3.3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificadas con el iniciador OPA16. Carriles de 1 a 5, y de 10 a 14: monospóricos de *Pm. aleophilum*. Carriles de 6 a 8, y de 15 a 16: Monospóricos de otras especies del género, en orden *Pm. scolyti*, *Pm. inflatipes* y *Pm. viticola*. Carril 9: Marcador de peso molecular. Las flechas negras indican bandas monomórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas blancas indican bandas polimórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas grises indican bandas observadas en otras especies del género.

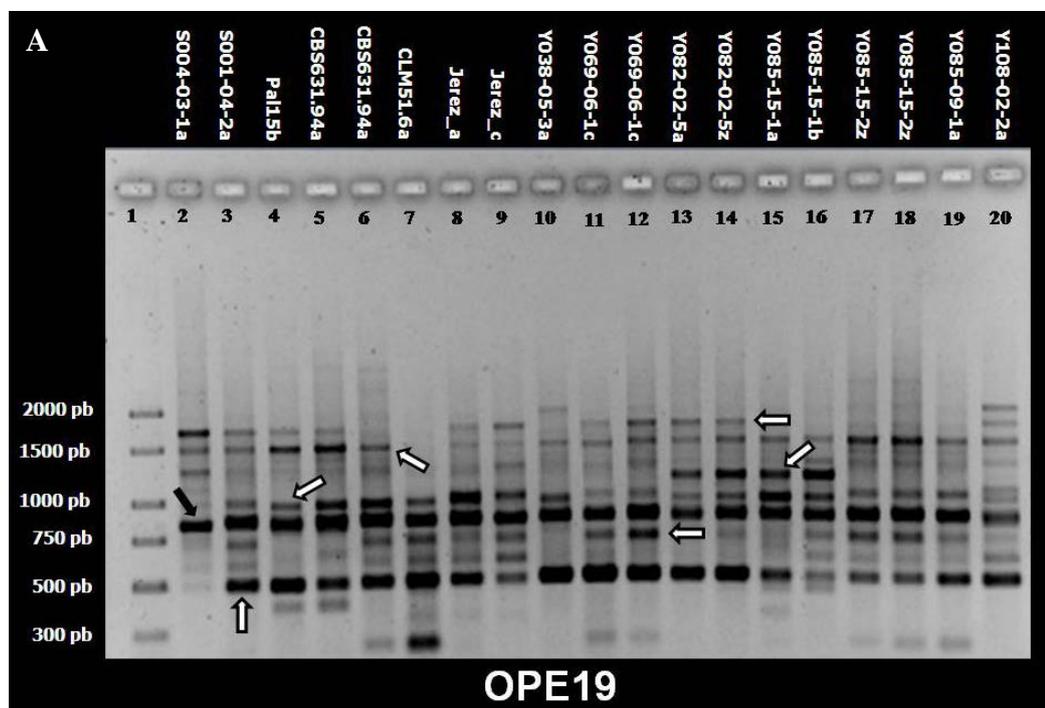


Figura 3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificadas en la caracterización mediante RAPD. A: Fragmentos amplificadas con el iniciador OPE19. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles de 2 a 20: monospóricos de *Pm. aleophilum*. Las flechas negras indican bandas monomórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas blancas indican bandas polimórficas de *Pm. aleophilum*.

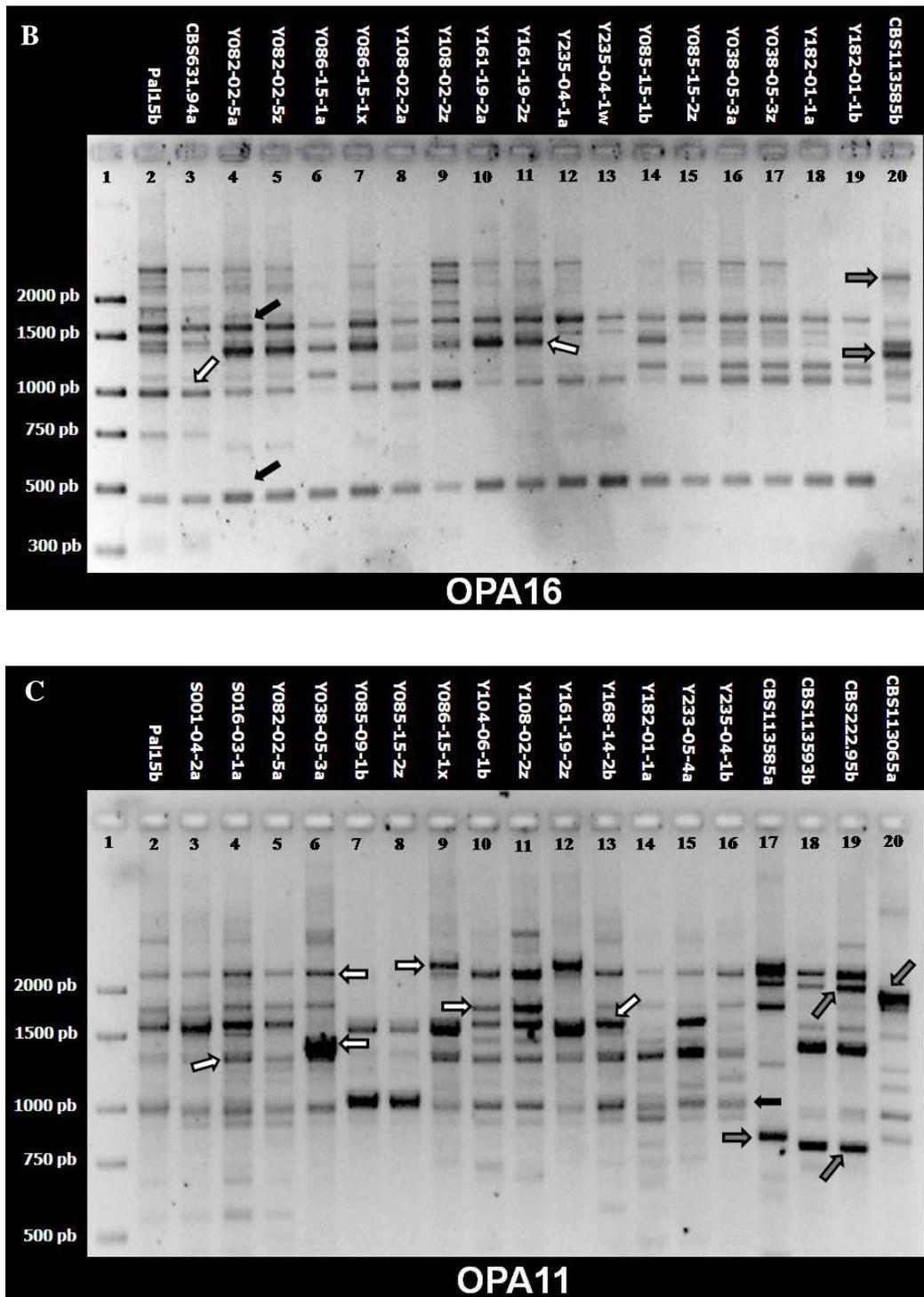


Figura 3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE en el que se muestran los patrones de bandas amplificadas en la caracterización mediante RAPD. **B:** Fragmentos amplificados con el iniciador OPA16. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles de 2 a 19: monospóricos de *Pm. aleophilum*. Carril 20: monospóricos de *Pm. parasiticum*. **C:** Fragmentos amplificados con el iniciador OPA11. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles de 2 a 16: monospóricos de *Pm. aleophilum*. Carriles de 17 a 20: monospóricos de otras especies del género, en orden *Pm. parasiticum*, *Pm. scolyti*, *Pm. inflatipes* y *Pm. viticola*. Las flechas negras indican bandas monomórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas blancas indican bandas polimórficas de *Pm. aleophilum*. Las flechas grises indican bandas observadas en otras especies del género.

La Figura 3.3.3 muestra las bandas obtenidas con los iniciadores OPE 19, OPA 16 y OPA 11, para 19 monospóricos. Se observa cómo algunos monospóricos presentan un mismo patrón de bandas. Por ejemplo los monospóricos Y082-02-5a, Y082-02-5z, Y086-15-1x, Y161-19-2a e Y161-19-2z comparten un mismo patrón de bandas amplificadas con el iniciador OPA16 (Figura 3.3.3 A). En la Figura 3.3.3 C, que muestra los fragmentos amplificadas con el iniciador OPA11, se observa como los monospóricos Y108-02-2z, Y104-06-1b y S016-03-1a tienen un mismo patrón de bandas, mientras los monospóricos Y233-05-4a, Y168-14-2b e Y086-15-1x comparten un patrón de bandas distinto del anterior.

3.3.1.1. Análisis inter-específico

El número de fragmentos amplificadas en la especie *Pm. aleophilum* fue mayor (92) que en las otras especies del género estudiadas (Tabla 3.3.2), debido al mayor número de monospóricos analizados (N = 36). Se reconocieron un total de 16 bandas o marcadores monomórficos presentes en todos los monospóricos de *Pm. aleophilum*. Aunque solamente 12 fueron bandas monomórficas exclusivas de esta especie, porque cuatro de éstos marcadores fueron amplificadas en, al menos, una de las otras especies del género incluídas en el ensayo.

Para el resto de especies estudiadas se obtuvo un número menor de bandas amplificadas y bandas específicas, debido a que se analizó un único aislado en todos los casos. A partir del ADN de los monospóricos de *Pm. viticola* y *Pm. parasiticum* se amplificaron un total de 29 y 32 fragmentos, respectivamente. De ellos, 5 bandas fueron exclusivas de la especie *Pm. viticola* y 10 fueron exclusivas de *Pm. parasiticum*.

Todos los fragmentos obtenidos con ADN de los aislados *Pm. scolyti* (CBS113593) y *Pm. inflatipes* (CBS222.95) fueron idénticos, obteniéndose un total de 38 bandas, de las cuáles 13 fueron exclusivas. Los resultados obtenidos para cada especie se resumen en la Tabla 3.3.2.

Tabla 3.3.2. Número de bandas presentes y ausentes en cada una de las especies de *Phaeoacremonium* analizadas mediante RAPD. _m: bandas monomórficas; _p: bandas polimórficas.

Especie del género	<i>Pm. scolyti</i>	<i>Pm. viticola</i>	<i>Pm. parasiticum</i>	<i>Pm. inflatipes</i>	<i>Pm. aleophilum</i>
					92
Bandas presentes	38	29	32	38	16 _m 76 _p
Bandas ausentes	93	102	99	93	39
Total bandas valoradas	131	131	131	131	131
Bandas presentes exclusivas	13	5	10	13	12
Bandas ausentes exclusivas	0	0	1	0	1

i. Análisis de semejanza genética

En la Figura 3.3.4 se ilustra el dendograma creado mediante el algoritmo UPGMA tras calcular el coeficiente de similitud con los 131 marcadores obtenidos. En el dendograma se puede observar cómo todos los aislados de la especie *Pm. aleophilum* forman un claro grupo bien diferenciado del resto (100% bootstrap). Como ya se ha citado anteriormente las especies *Pm. scolyti* y *Pm. inflatipes* aparecen formando un único grupo debido a su máxima similitud.

Para la planta Y085 se analizaron tres aislados diferentes: Y085-09-1 (monospórico Y085-09-1b), Y085-15-1 con dos monospóricos (Y085-15-1a e Y085-15-1b) y el aislado Y085-15-2 (monospórico Y085-15-2z). En la Figura 3.3.2 se muestran distantes. Los monospóricos Y085-15-2z e Y085-09-1b se agrupan conjuntamente con un 72% de remuestreo o “bootstrap”. Sin embargo, los dos monospóricos del aislado Y085-15-1 se disponen en otro grupo cercanos a los aislados de la planta Y086 (Figura 3.3.4). Estos datos sugieren que en la planta Y085 existían al menos dos grupos de perfiles genéticos de *Pm. aleophilum* bien diferenciados.

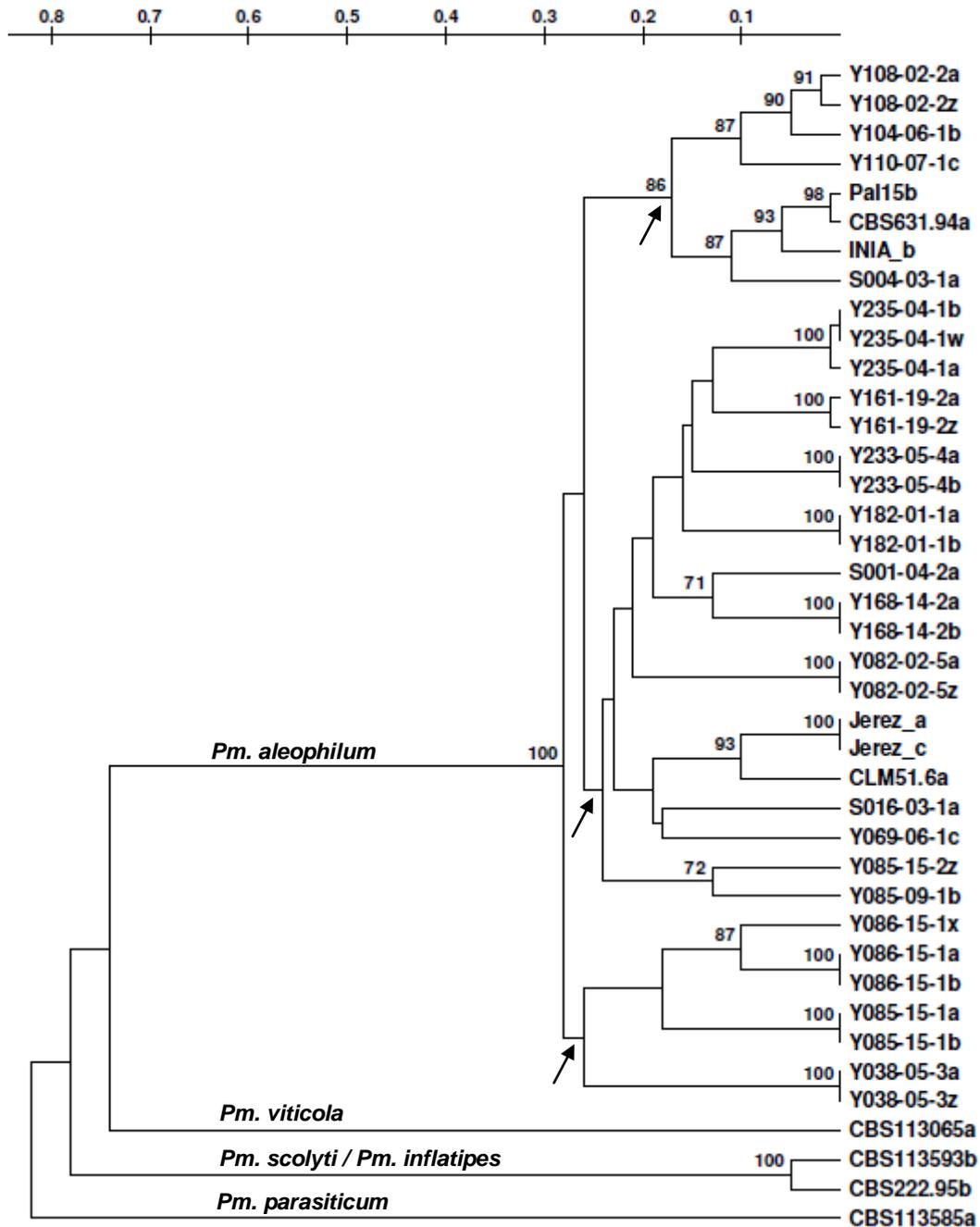


Figura 3.3.4: Dendrograma construido a partir del coeficiente de similitud calculado según Nei & Li (1979) con la matriz de datos binarios basada en 131 marcadores RAPD de los 40 monospóricos de *Phaeoacremonium* analizados. Los tres grupos establecidos dentro de la especie *Pm. aleophilum* se indican con una flecha en el nodo de partida. Los números revelan los valores de bootstrap superiores al 65%.

ii. Análisis de agrupamiento

La aplicación del programa Structure v2.2. (análisis bayesiano) reveló que la población de los 40 monospóricos analizados se estructuraba, de acuerdo con la mayor probabilidad [$\Pr(X/K) = -1429$], en cinco grupos ($K = 5$). Las

probabilidades más próximas fueron encontradas con $K = 4$ ($Pr = -1616$) y $K = 6$ ($Pr = -1565$). La Figura 3.3.5 A, muestra los resultados obtenidos tras realizar el análisis bayesiano utilizando el programa Structure v2.2 con $K = 5$. El primer grupo contenía los monospóricos de las especies *Pm. inflatipes* y *Pm. scolyti*, mientras un segundo grupo contenía los monospóricos de las especies *Pm. parasiticum* y *Pm. viticola*. Los cultivos monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* fueron divididos en tres grupos (R-I, R-II/R-III y R-IV).

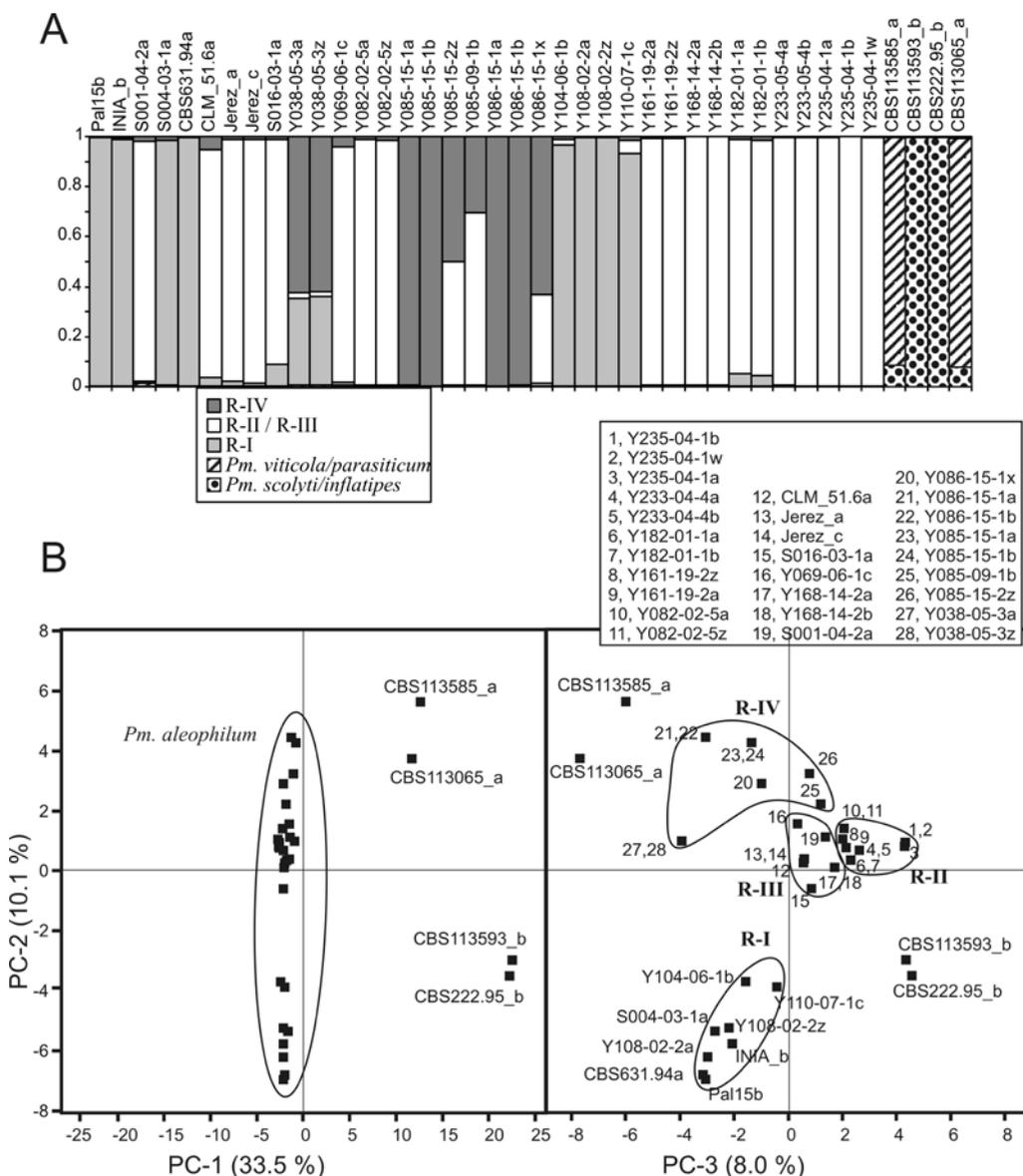


Figura 3.3.5. Resultados del análisis de agrupamiento realizado a partir de los 131 marcadores RAPDs de los 40 monospóricos de *Phaeoacremonium* caracterizados en este trabajo. **A:** Probabilidad de asignación de cada monospórico a los 5 grupos definidos por el análisis bayesiano (Structure v2.2). **B:** Proyección de todos los monospóricos de *Phaeoacremonium* en el plano de los componentes principales PC-1 y PC-2, o PC-3 y PC-2. Los porcentajes de varianza explicada por cada componente se indican debajo de cada eje entre paréntesis.

La Figura 3.3.5 B representa la proyección de los monospóricos analizados sobre los dos componentes principales, que explican el 33,5% y 10,1% de la variabilidad genética total, respectivamente. El primer componente (PC-1) separa claramente la especie *Pm. aleophilum* del resto. El segundo componente (PC-2) discrimina entre un grupo que contiene *Pm. inflatipes* y *Pm. scolyti* (parte negativa del eje), y otro que contiene *Pm. parasiticum* y *Pm. viticola* (parte positiva del eje). La proyección de los monospóricos sobre el plano compuesto por el segundo componente principal (PC-2) y el tercero (PC-3), que explica el 8% de la variabilidad genética total, muestra además subdivisiones intra-específicas en *Pm. aleophilum*. Por lo tanto el análisis multivariante PCA confirmó los grupos inferidos por el análisis bayesiano y el dendograma UPGMA basado en el coeficiente de similitud.

3.3.1.2. Análisis intra-específico de *Pm. aelophilum*

Para el conjunto de los 36 monospóricos de *Pm. aleophilum* estudiados se obtuvieron un total de 76 bandas polimórficas y 16 bandas monomórficas. La distribución de estos fragmentos amplificados según el iniciador empleado se muestra en la Tabla 3.3.3.

Tabla 3.3.3. Número de bandas observadas y número de haplotipos generados en el análisis de la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante RAPD. NT: nº de bandas totales amplificadas. Np: nº de bandas polimórficas. Nm: nº de bandas monomórficas. La expresión de la media va seguida del error estándar.

Iniciador	NT	Np	Nm	Nº de haplotipos
OPD 8	6	6	0	12
OPO 15	7	6	1	11
OPA 2	9	8	1	15
OPE 19	7	6	1	16
OPD 16	9	9	0	10
OPA 16	4	2	2	3
OPE 3	8	7	1	13
OPC 8	8	7	1	11
OPA 11	9	8	1	18
OPA 8	6	5	1	8
OPE 20	9	5	4	10
OPD 2	10	7	3	13
Total	92	76	16	27
Media	7,67±0,5	6,33±0,53	1,33±0,33	11,7±1,13

Para determinar la presencia de bandas en cada aislado se emplearon muestras de ADN de dos o más cultivos monospóricos originales del mismo aislado o población en un total de 12 casos (apartado 3.2.1.2 y Tabla 3.2.5). El programa TULKAS permite estimar la variabilidad dentro de una población (aislado en este caso) atendiendo a la fijación de alelos en distintos loci o marcadores. La Tabla 3.3.4 muestra el resultado de este análisis en los 12 aislados para los que fueron analizados más de un cultivo monospórico. En siete de los 12 casos estudiados, los monospóricos procedentes de un mismo aislado fueron idénticos. Sin embargo, en cuatro ocasiones se observaron diferencias mínimas (1 o 2 bandas) en el perfil genético de monospóricos de un mismo aislado. Solo en el aislado Y086-15-1 se encontraron 11 marcadores variables (12%) analizando tres monospóricos (Tabla 3.3.4). No obstante, los ensayos realizados no permiten tener datos suficientes para hablar de variabilidad dentro de un aislado o población porque el número de cultivos monospóricos analizado fue demasiado reducido.

Tabla 3.3.4. Análisis de los 92 loci generados en el ensayo RAPD en los 12 aislados para los que se examinaron al menos dos cultivos monospóricos. F1: número de loci fijados en la población o aislado para el alelo determinado por presencia de banda. F0: número de loci fijados por ausencia de banda. VAR: número de loci variables entre los monospóricos de un mismo aislado.

Aislado	Nº monospóricos comparados	F1	F0	VAR	%VAR
Y038-05-3	2	53	39	0	0,0
Y082-02-5	2	63	29	0	0,0
Y085-15-1	2	50	42	0	0,0
CBS631.94	2	59	32	1	1,1
Y168-14-2	2	57	35	0	0,0
Jerez	2	55	37	0	0,0
Y108-02-2	2	59	31	2	2,2
Y086-15-1	3	50	31	11	12,0
Y233-05-4	2	52	40	0	0,0
Y161-19-2	2	62	29	1	1,1
Y182-01-1	2	55	37	0	0,0
Y235-04-1	3	57	34	1	1,1
Global	26	16	0	76	82,6
Media	2,1	56	34,6	1,3	1,46

i. Diversidad genética

La presencia o ausencia de las bandas en los distintos monospóricos de *Pm. aleophilum* estudiados (N = 36) ha constituido el patrón genético específico de cada uno. Cada uno de los patrones de bandas diferenciados fue considerado un haplotipo. Como se muestra en la Tabla 3.3.3, se diferenciaron 27 haplotipos en los que fueron clasificados los 36 monospóricos de *Pm. aleophilum*. En consecuencia el valor de diversidad genética estimado como G/N fue igual a $27/36 = 0,75$. El índice de Shannon-Weaver fue de 3,24 y el índice de Shannon normalizado resultante fue de 0,90.

ii. Análisis intra-específico de distancias genéticas (NJ)

En el dendograma generado con el algoritmo UPGMA (Figura 3.3.4) se han diferenciado tres grandes grupos dentro de la especie *Pm. aleophilum*, sin embargo sólo el grupo de la parte superior presenta un valor de remuestreo mayor del 85%. Este tipo de análisis no permitió definir claramente los grupos intra-específicos y no proporcionó un buen soporte a los datos. Para obtener un mejor soporte de la variación genética intra-específica de *Pm. aleophilum* se recurrió a un segundo tipo de análisis empleando únicamente los 92 marcadores exclusivos de esta especie.

Se construyeron dos dendogramas (Figuras 3.3.6 y 3.3.7) basados en dos matrices de distancia utilizando el método Neighbor-Joining (NJ). En la construcción de los dendogramas se incluyeron los 27 haplotipos diferenciados de *Pm. aleophilum*, y *Pm. parasiticum* fue utilizado como outgroup para establecer la raíz.

El dendograma basado en el índice de Jaccard (Figura 3.3.6) permitió subdividir los 36 monospóricos estudiados en cuatro grupos: R-I, R-II, R-III y R-IV.

El **grupo R-I** resultó estar bien soportado por el análisis de remuestreo o bootstrap (> 90 %). A su vez estuvo dividido en dos subgrupos soportados por más de un 70% de bootstrap. El primer subgrupo contenía todos los monospóricos aislados de cepas jóvenes con síntomas de enfermedad de Petri y cultivadas en Extremadura (Y108-02-2z, Y108-02-2a, Y104-06-1b e Y110-07-

1c). El segundo subgrupo contenía los monospóricos de los aislados de referencia obtenidos del CBS (Pal15b y CBS631.94a) y el INIA (INIA_b), junto con el monospórico S004-03-1a, aislado de una planta joven con enfermedad de Petri cultivada en la D.O. Ribera del Duero. Todos los aislados de plantas jóvenes con síntomas de enfermedad de Petri fueron clasificados en el grupo R-I.

El **grupo R-II** incluía 11 monospóricos (Y235-04-1b, Y235-04-1w, Y235-04-1a, Y233-05-4a, Y233-05-4b, Y182-01-1a, Y182-01-1b, Y161-19-2z, Y161-19-2a, Y082-02-5a e Y082-02-5z). Todos ellos fueron aislados de plantas adultas con síntomas de yesca y/o eutipiosis procedentes de diferentes áreas geográficas.

El **grupo R-III** constaba de dos nodos secundarios. El primer subgrupo estuvo conformado por los monospóricos CLM_51.6a, Jerez_a, Jerez_c, S016-03-1a y Y069-06-1c. El segundo subgrupo contenía los monospóricos Y168-14-2a, Y168-14-2b y S001-04-2a, aislados de plantas adultas con síntomas típicos de yesca. Los grupos R-II y R-III mostraron tendencia a agrupar los aislados de *Pm. aleophilum* obtenidos de cepas adultas afectadas por yesca. Aunque el soporte de ambos grupos en el análisis de remuestreo fue menor del 70 %.

El **grupo R-IV** contenía nueve monospóricos (Y086-15-1x, Y086-15-1a, Y086-15-1b, Y085-15-1a, Y085-15-1b, Y085-09-1b, Y085-15-2z, Y038-05-3a e Y038-05-3z) procedentes de tres plantas cultivadas en Castilla y León y dos de ellas (Y085 e Y086) mostraron síntomas de eutipiosis. El soporte del grupo R-IV en el análisis bootstrap fue menor del 70 %.

El dendograma basado en la proporción de bandas compartidas (Q_{xy}) mostró resultados muy similares (Figura 3.3.7).

Los grupos R-I y R-III no sufrieron ninguna modificación en el contenido de monospóricos. Sin embargo el grupo R-II pareció significativamente más desestructurado y los monospóricos Y082-02-5a e Y082-02-5z obtenidos a partir de una planta adulta con síntomas de eutipiosis y cultivada en Toro pasaron a formar parte del grupo R-IV. El grupo R-IV contenía todos los monospóricos de plantas con síntomas típicos de eutipiosis.

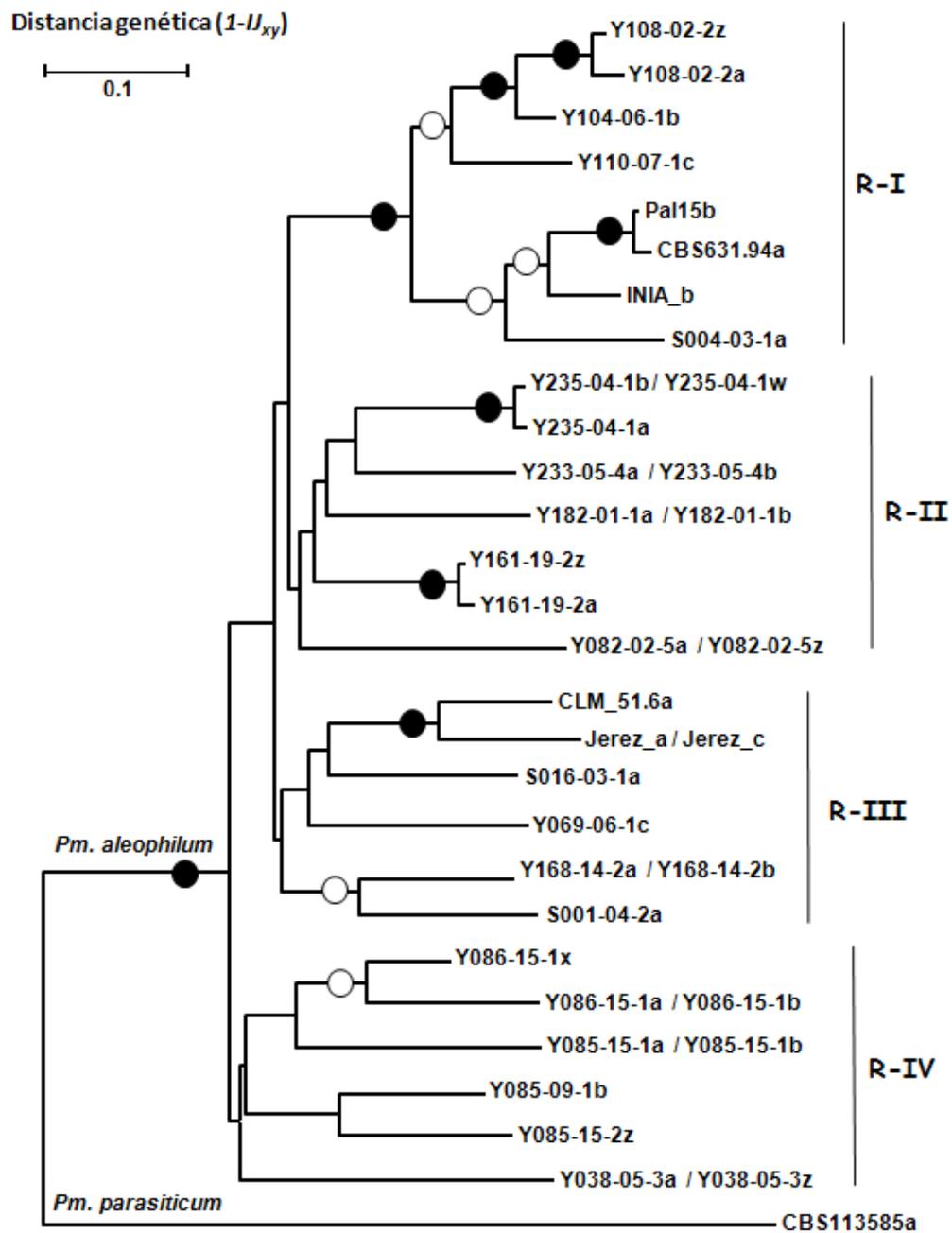


Figura 3.3.6. Dendrograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{xy})$ de los 27 haplotipos diferentes de *Pm. aleophilum* derivados del análisis RAPD. Los círculos negros indican valores de bootstrap comprendidos entre el 90 y el 100%. Los círculos blancos indican valores de bootstrap comprendidos entre el 70 y el 89%.

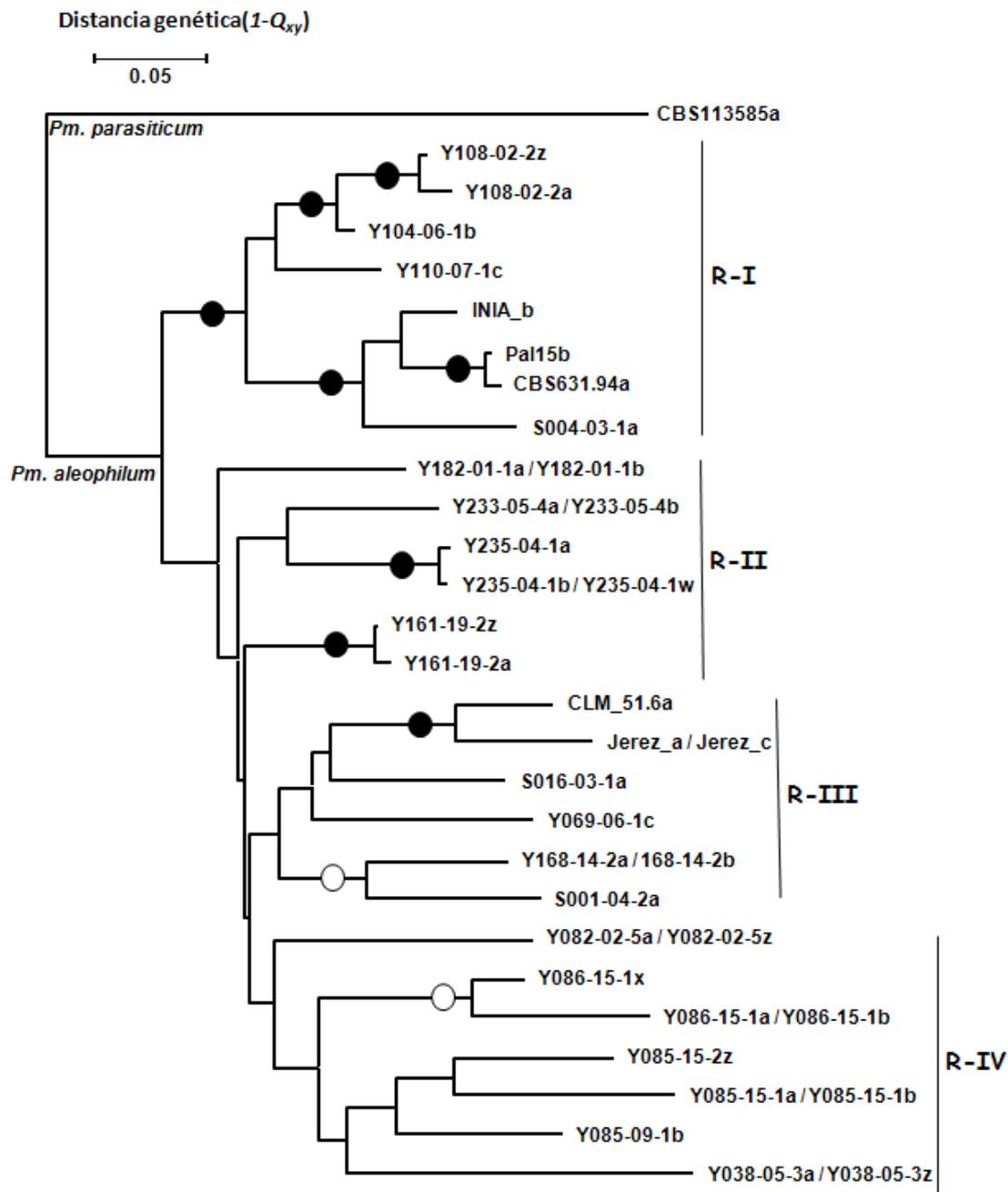


Figura 3.3.7. Dendrograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - Q_{xy})$ de los 27 haplotipos diferentes de *Pm. aleophilum* derivados del análisis RAPD. Los círculos negros indican valores de bootstrap comprendidos entre el 90 y el 100%. Los círculos blancos indican valores de bootstrap comprendidos entre el 70 y el 89%.

El análisis mediante el test de Mantel ofreció un buen resultado, obteniéndose entre las dos matrices de distancia calculadas un valor de ajuste $R = 0,9882$. Este resultado indica que, a pesar de las diferencias observadas visualmente los dos métodos de cálculo de distancia están bien correlacionados y los dendrogramas generados soportan bien los datos iniciales.

iii. Análisis de agrupamiento

El análisis bayesiano realizado con el programa Structure v2.2 reveló la existencia de tres grupos en la población de monospóricos de *Pm. aleophilum* estudiada (Figura 3.3.5 A). Al comparar estos resultados con los inferidos en los dendogramas de tipo NJ basados en distancias, se concluye que los grupos R-II y R-III no fueron distinguidos en el análisis de agrupamiento bayesiano (ni siquiera cuando se probó $K = 7$).

La mayoría de los monospóricos investigados fueron incluidos en uno de los tres grupos con elevada probabilidad ($> 0,9$) (Figura 3.3.5 A), concordando con los resultados de los análisis NJ. Las menores probabilidades fueron encontradas en la asignación de determinados monospóricos al grupo R-IV. Así para los monospóricos Y038-05-3a, Y038-05-3z, Y085-15-2z, Y085-09-1b e Y086-15-1x, se obtuvo una probabilidad de 0,623, 0,621, 0,500, 0,305 y 0,633, de pertenencia al grupo R-IV, respectivamente (Figura 3.3.5 A). Con estos datos los monospóricos Y085-15-2z pueden interpretarse como haplotipos intermedios y el aislado Y085-09-1b se clasificaría en el grupo R-II/R-III. Este hecho ya fue puesto de manifiesto en el dendograma basado en el coeficiente de similitud utilizando el algoritmo UPGMA (Figura 3.3.4).

El análisis de componentes principales también reveló tres grupos intra-específicos en *Pm. aleophilum*. Nuevamente los grupo R-II y R-III no fueron claramente delimitados (Figura 3.3.5 B). La proyección espacial de los monospóricos estudiados en el plano formado por el segundo (PC-2) y tercer componente principal (PC-3) muestran una importante divergencia entre los monospóricos del grupo R-I y los del grupo R-IV.

En conclusión los análisis de agrupamiento (Bayesiano y PCA) fueron concordantes con los análisis de distancias genéticas, demostrando la existencia de tres grupos robustos en la población de *Pm. aleophilum* estudiada.

3.3.2. Caracterización molecular mediante la técnica AFLP

3.3.2.1. Análisis intra-específico de *Pm. aleophilum*

Para realizar el análisis por AFLP se seleccionaron 17 cultivos monospóricos de la especie *Pm. aleophilum*. Por lo tanto, los resultados obtenidos ofrecen información sobre la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*. Los patrones de fragmentos amplificados fueron constantes y reproducibles en las repeticiones realizadas y entre las muestras de ADN extraído por duplicado para cada monospórico.

En conjunto tomando los datos de las cinco combinaciones probadas, se obtuvieron un total de 358 marcadores de los cuales 308 fueron polimórficos y 50 monomórficos, presentes en los 17 aislados analizados. El menor número de marcadores se obtuvo con la combinación A (*EcoRI*-AA/*MseI*-CGA), mientras el máximo número de fragmentos amplificados se obtuvo con la combinación E (*EcoRI*-AA/*MseI*-CA). El número medio de fragmentos amplificados por reacción fue de ~ 72. La distribución de los fragmentos amplificados según la combinación utilizada se muestra en la Tabla 3.3.5. El número de perfiles genéticos o haplotipos fue muy elevado en todos los casos, no siendo posible establecer un mismo perfil genético para dos monospóricos.

Tabla 3.3.5. Número de fragmentos amplificados y número de haplotipos generados en el análisis de la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante AFLP. NT: n° de fragmentos totales amplificados, Np: n° de fragmentos polimórficos, Nm: n° de fragmentos monomórficos.

Combinación		NT	Np	Nm	N° de haplotipos
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>				
AA	CGA	20	16	4	15
AA	CC	90	82	8	17
AA	CG	64	50	14	15
AA	CT	89	84	5	15
AA	CA	95	76	19	17
Total		358	308	50	17
Media		71,6±14,0	61,6±12,9	10±2,9	15,8±0,5

La Figura 3.3.8 muestra los fluorogramas obtenidos para cuatro monospóricos estudiados con la combinación D (*EcoRI*-AA/*MseI*-CT). En la figura se aprecian hasta seis picos diferentes correspondientes a marcadores

polimórficos. Además los monospóricos Y108-02-2z e Y104-06-1b presentaron el mismo patrón de marcadores genéticos en esta región.

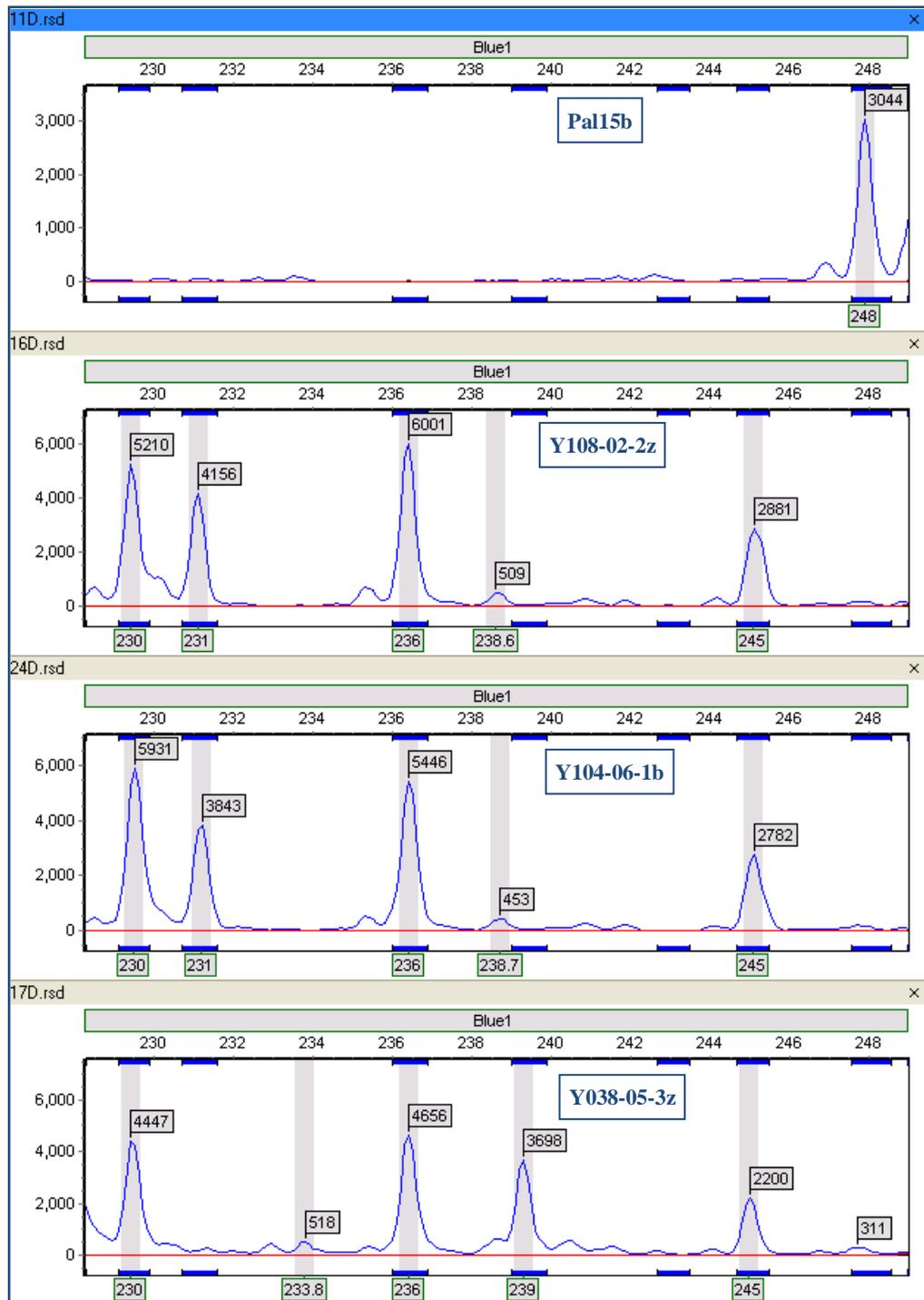


Figura 3.3.8. Imagen obtenida con el software GeneMarker, para la verificación manual de los marcadores AFLPs. La figura muestra los resultados de cuatro monospóricos de *Pm. aleophilum* amplificadas con la combinación *EcoRI-AA/MseI-CT*.

En el análisis por AFLP únicamente se seleccionaron tres aislados para evaluar la variabilidad de una misma población original (Y038-05-3, Jerez e Y086-15-1). De cada uno de ellos se analizaron dos monospóricos distintos (Tabla 3.2.5). La Tabla 3.3.6 refleja el resumen de los datos obtenidos en el análisis de la variabilidad dentro de un aislado atendiendo a la fijación de alelos en distintos loci o marcadores.

Tabla 3.3.6. Análisis de los 358 loci generados en el ensayo AFLP en los 3 aislados para los que se examinaron dos cultivos monospóricos. F1: número de loci fijados en la población o aislado para el alelo determinado por presencia de banda. F0: número de loci fijados por ausencia de banda. VAR: número de loci variables entre los monospóricos de un mismo aislado.

Aislado	Nº de monospóricos comparados	F1	F0	VAR	%VAR
Y038-05-3	2	187	159	12	3.4
Jerez	2	191	161	6	1.7
Y086-15-1	2	201	145	12	3.4
Global	6	50	0	308	86.0
Media	2	193	155	10	2,8

Los resultados obtenidos justifican el elevado número de haplotipos encontrados con el análisis AFLP ya que los tres aislados estudiados presentaron marcadores versátiles entre monospóricos. El número de fragmentos variables osciló entre 12 para los aislados Y038-05-3 e Y086-15-1, y seis para el aislado Jerez. Los aislados Y038-05-3 y Jerez no presentaron bandas variables en el análisis RAPD.

i. Diversidad genética

El valor de diversidad genética calculada a partir del análisis AFLP como G/N fue igual a $17/17 = 1,00$. El índice de diversidad de Shannon normalizado también fue 1,00.

ii. Análisis intra-específico de distancias genéticas (NJ)

Con los datos de presencia y ausencia de los 358 marcadores se construyeron dos matrices de distancia y sus dendogramas correspondientes, uno a partir del IJ_{xy} y otro a partir de la proporción Q_{xy} . En la construcción de los dendogramas se incluyeron los 17 monospóricos estudiados porque cada

uno resultó constituir un haplotipo. Los resultados de este análisis se muestran en las Figuras 3.3.9 y 3.3.10, respectivamente.

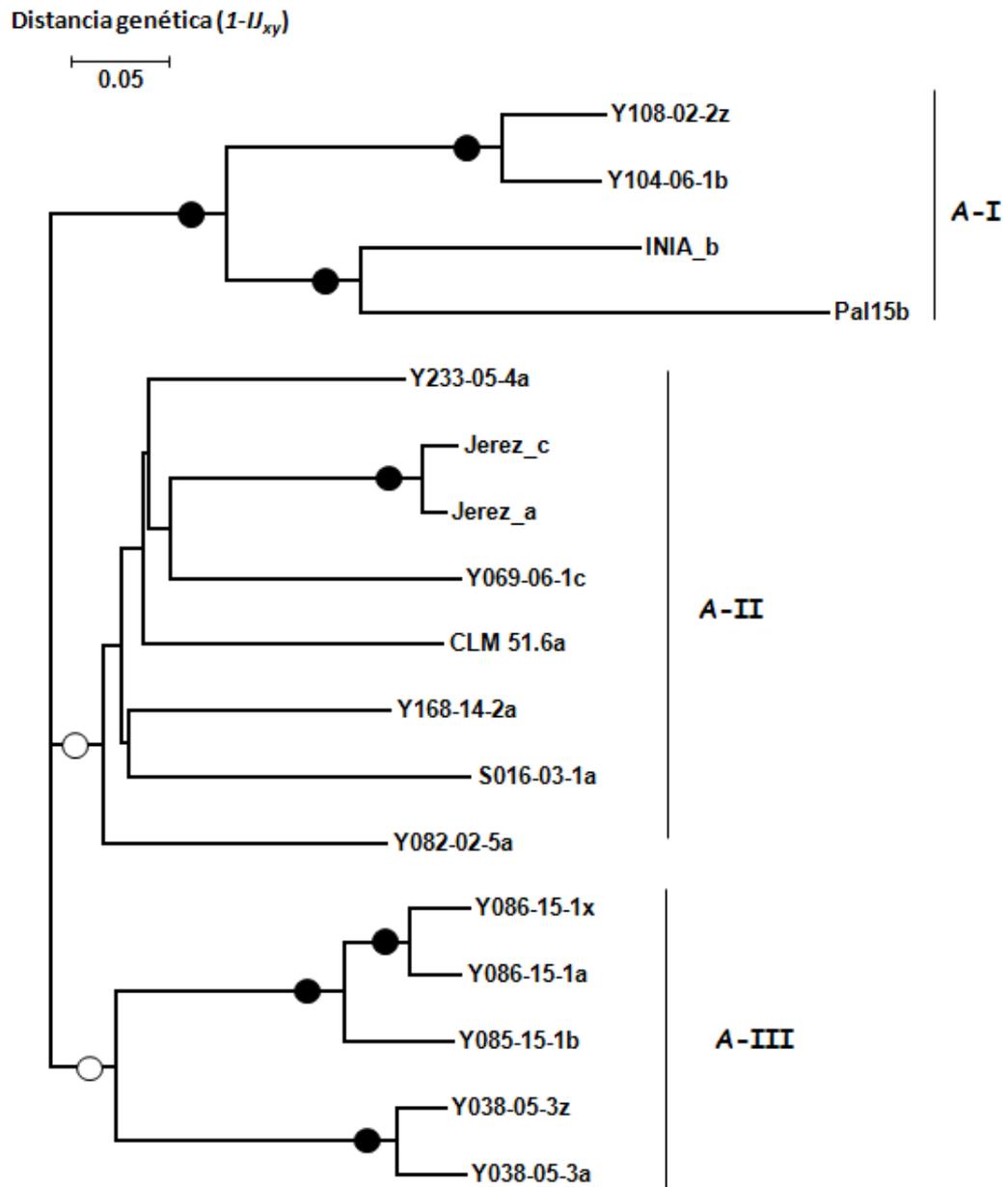


Figura 3.3.9. Dendrograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - I_{xy})$ de los 17 haplotipos diferentes de *Pm. aleophilum* derivados del análisis AFLP. Los círculos negros indican valores de bootstrap comprendidos entre el 90 y el 100%. Los círculos blancos indican valores de bootstrap comprendidos entre el 70 y el 89%.

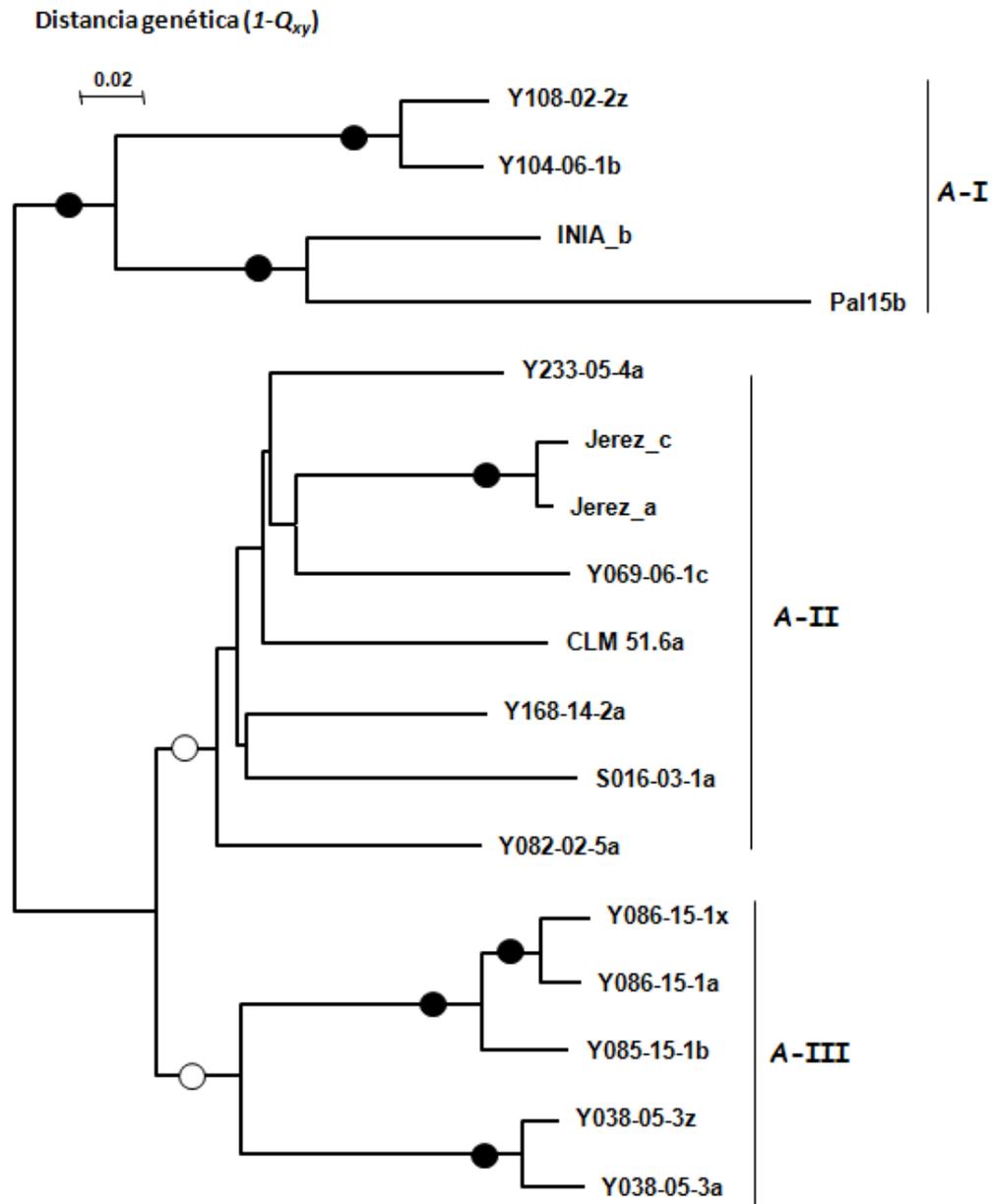


Figura 3.3.10. Dendrograma construido utilizando el método NJ a partir de la matriz de distancias estimada como $(1 - Q_{xy})$ de los 17 haplotipos diferentes de *Pm. aleophilum* derivados del análisis AFLP. Los círculos negros indican valores de bootstrap comprendidos entre el 90 y el 100%. Los círculos blancos indican valores de bootstrap comprendidos entre el 70 y el 89%.

Las Figuras 3.3.9 y 3.3.10 son idénticas en su topología y permiten diferenciar tres grupos (A-I, A-II y A-III) bien soportados por valores máximos de remuestreo. Esta similitud fue confirmada por el test de Mantel, con un valor de ajuste $R = 0,9964$.

El **grupo A-I** se correspondía con el grupo R-I resultante de la caracterización molecular mediante RAPD. Su configuración fue mantenida, dividiéndose en dos ramas soportadas por valores máximos de bootstrap. La primera contenía dos monospóricos (Y108-02-2z e Y104-06-1b) procedentes de plantas jóvenes con enfermedad de Petri y cultivadas en Extremadura. Y la segunda contenía los aislados adquiridos del INIA y el CBS.

El grupo R-II no tiene homólogo en el análisis mediante AFLP, porque no se analizaron los aislados Y182-01-1 e Y235-04-1. En consecuencia el monospórico Y233-05-4a, aislados de una planta adulta con yesca, pasó a formar parte del grupo denominado A-II.

El **grupo A-II** fue relacionado con el grupo R-III del análisis con RAPD y se divide en dos subgrupos. El primer subgrupo aproxima cinco monospóricos (Y233-05-4a, Jerez_a, Jerez_c, Y069-06-1c y CLM51.6a) con diferente origen geográfico. El segundo subgrupo consta de los monospóricos Y168-14-2a y S016-03-1a, procedentes de plantas adultas con síntomas de yesca. El grupo A-II incluye también el monospórico Y082-02-5a, aislado de una planta con síntomas de eutipiosis.

Respecto al **grupo A-III** se observa como contiene los monospóricos de las plantas Y085 e Y086, afectadas por eutipiosis, en un subgrupo y los monospóricos de la planta Y038 en la rama inferior. Su topología concuerda perfectamente con el grupo R-IV obtenido mediante el análisis por RAPD.

El test de regresión de Mantel entre las matrices de distancias genéticas calculadas a partir de los marcadores RAPDs y AFLPs reveló los siguientes valores de ajuste: $R = 0,6294$ entre las matrices calculadas como $1 - IJ_{xy}$, y $R = 0,5931$ entre las matrices calculadas como $1 - Q_{xy}$.

iii. Análisis de agrupamiento

El análisis de la estructura poblacional de *Pm. aleophilum* desarrollado con el programa Structure v2.2 estableció la subdivisión de los 17 monospóricos analizados en tres grupos ($K = 3$), de acuerdo con el mayor valor de probabilidad [$\Pr (X/K) = -2313$]. Se obtuvieron valores menores [$\Pr (X/K) = -2456$ y -2419] para $K = 2$ y $K = 4$, respectivamente. La Figura 3.3.11 A

muestra los resultados de agrupamiento derivados del análisis bayesiano de los marcadores AFLPs con $K = 3$.

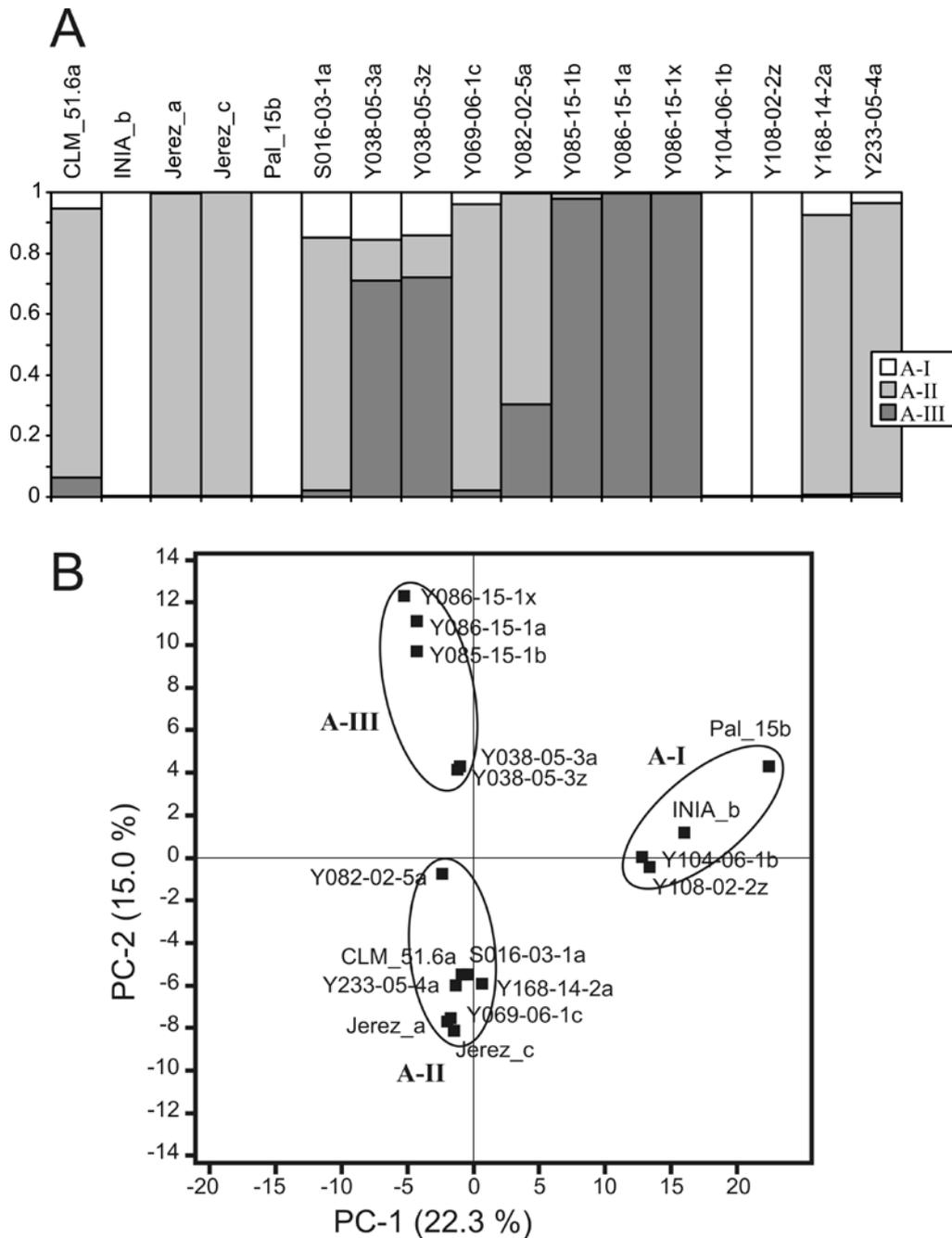


Figura 3.3.11. Resultados del análisis de agrupamiento realizado a partir de los 358 marcadores AFLPs de los 17 monospóricos de *Pm. aleophilum* caracterizados en este trabajo. **A:** Probabilidad de asignación de cada monospórico a los 3 grupos definidos por el análisis bayesiano (Structure v2.2). **B:** Proyección de los 17 monospóricos de *Pm. aleophilum* en el plano de los componentes principales PC-1 y PC-2. Los porcentajes de varianza explicada por cada componente se indican debajo de cada eje entre paréntesis.

El primer grupo (A-I) contenía cuatro monospóricos (Y108-02-2z, Y104-06-1b, Pal15b e INIA_b), todos ellos con valores de probabilidad $> 0,995$. Al grupo A-II se asignaron ocho monospóricos. La probabilidad de pertenecer a este grupo fue $> 0,9$ en todos los monospóricos excepto CLM51.6a (0,883), S016-03-1a (0,832) e Y082-02-5a (0,691). El tercer grupo (A-III) contenía cinco monospóricos (Y038-05-3a, Y038-05-3z, Y085-15-1b, Y086-15-1a y Y086-15-1x), con probabilidades de asignación que variaron entre 0,7 y 1,0 (0,710, 0,722, 0,978, 0,997 y 0,997, respectivamente).

El análisis multivariante (PCA) de los marcadores AFLP también reveló la división de los monospóricos de *Pm. aleophilum* en tres grupos (Figura 3.3.11 B). El primer componente principal (PC-1) explicó el 22,3% de la variabilidad genética y el segundo componente (PC-2) explicó el 15% de la variabilidad genética total. En la proyección de los 17 monospóricos estudiados sobre el plano formado por el primer y segundo componentes, se visualizaron los grupos A-I, A-II y A-III. Los grupos obtenidos fueron concordantes con los establecidos en el análisis bayesiano y los reflejados en los dendogramas de distancias genéticas.

3.3.3. Caracterización molecular mediante análisis de secuencias

3.3.3.1. Región ITS

i. Análisis BLASTN

Los oligonucleótidos ITS5 e ITS4 amplificaron un fragmento del tamaño esperado en los 36 cultivos monospóricos y los dos aislados analizados. En total se obtuvieron 38 secuencias que fueron editadas y sometidas a un análisis de tipo BLASTN. Los resultados confirmaron la identidad de las distintas especies del género *Phaeoacremonium*. Las secuencias de 30 cultivos monospóricos presentaron una elevada homología con secuencias de la especie *Pm. aleophilum*. La secuencia ITS del monospórico Y271-03-1d presentó una homología del 99% con la secuencia EU128046 de *Togninia viticola*, mientras para el monospórico Y549-09-3b se obtuvo una homología del 97% con la secuencia AF118140 de *Pm. inflatipes*. Las secuencias del aislado Y270-16-1 fue 100% homóloga a la secuencia EU427312 de *Pm. mortoniae*. Para la

secuencia ITS del aislado Y277-14-1 se detectaron homologías del 100% con las secuencias EU128030 y AY159787 de *Pm. iranianum* y *Pm. aleophilum*, respectivamente. Los monospóricos procedentes de los cuatro aislados tipo del CBS (CBS113065, CBS113585, CBS113593 y CBS222.95), secuenciados en este trabajo, mostraron elevadas homologías con la especie correspondiente (Tabla 3.2.5), con excepción del monospórico CBS222.95b cuya secuencia fue homóloga a las de la especie *Pm. scolyti*.

ii. Alineamiento y filogenia

El alineamiento obtenido a partir de las 38 secuencias de la región ITS contenía 542 caracteres, de los cuales 89 fueron variables y 453 constantes. La similitud entre las especies del género *Phaeoacremonium* estudiadas fue del 83,6%.

En el estudio filogenético de la región ITS se incluyeron 11 secuencias de *Phaeoacremonium* spp. obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 3.2.8) y una secuencia de *Phaeomoniella chlamydospora*, utilizada como outgroup. Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. Con el método NJ se construyó un árbol filogenético en el que se identificaron seis clados (Figura 3.3.12).

El primer clado agrupó las secuencias de los aislados de las especies *Pm. aleophilum* y *Pm. iranianum* y estuvo soportado con un valor del 99% en el análisis de remuestreo. El segundo clado agrupó las secuencias de la especie *Pm. mortinae* (99% bootstrap) y el tercero las secuencias de *Pm. viticola* (95% bootstrap). El cuarto clado agrupó el monospórico Y549-09-3b con la secuencia AF197990 de *Pm. inflatipes* (91% bootstrap). Finalmente, las especies *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti* conformaron sendos clados, soportados por valores de bootstrap del 100% y el 99%, respectivamente.

La secuencia obtenida a partir del aislado tipo CBS222.95 (*Pm. inflatipes*) se agrupó con las secuencias de *Pm. scolyti*. Otra secuencia de este mismo cultivo (CBS222.95, ver Tabla 3.2.8) depositada por Tegli *et al.* (2000) en la base de datos con el número de acceso AF266655 fue incluida en el primer clado correspondiente a *Pm. aleophilum* y *Pm. iranianum*.

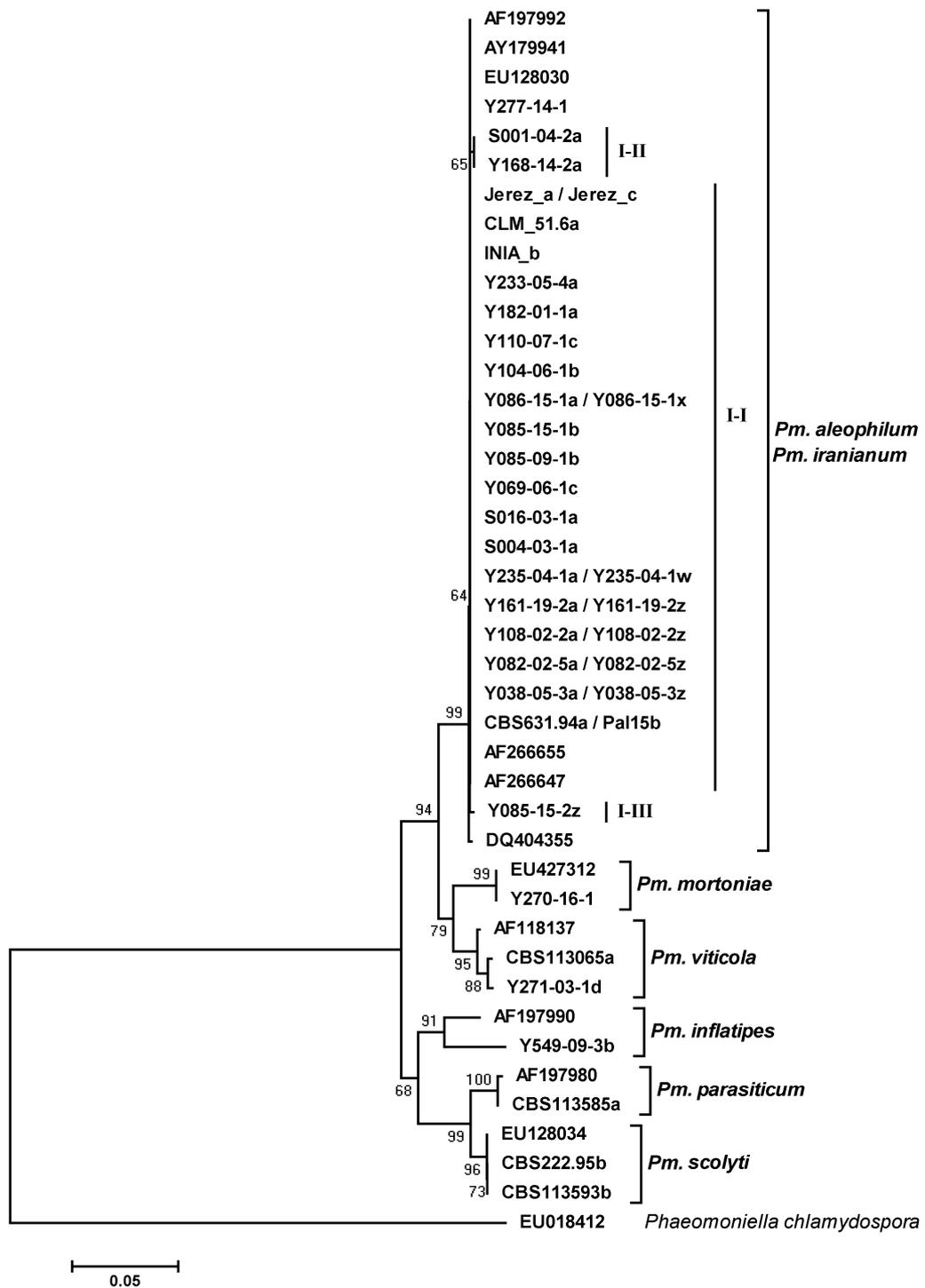


Figura 3.3.12. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones mayores del 60%.

iii. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

En el primer grupo de la Figura 3.3.12 (*Pm. aleophilum* / *Pm. iranianum*) la secuencia del aislado Y277-14-1 fue idéntica a las secuencias EU128030,

AF197992 e AY179941 identificadas como *Pm. iranianum*, *Pm. aleophilum* y *T. minima*, respectivamente. Sin embargo todas ellas presentaron dos nucleótidos distintos respecto a los demás miembros del primer clade que no fueron informativos.

Al comparar las secuencias de los 30 cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados, se detectaron dos nucleótidos variables en la región ITS1, de los cuales sólo uno fue informativo. Los aislados Y168-14-2a y S001-04-2a presentaron una guanina en la base I189 frente a la adenina detectada en el resto de secuencias. El carácter no informativo lo presentó el aislado Y085-15-2z con una guanina en la posición I162 en lugar de la adenina observada en todos los demás monospóricos. Estas diferencias aunque mínimas, permitieron dividir los aislados de *Pm. aleophilum* en tres grupos: I-I, I-II e I-III en base al análisis de la región ITS (Figura 3.3.12).

3.3.3.2. β -tubulina, exones 2 a 6

i. Análisis BLASTN

La amplificación de los exones 2 al 6 del gen de la β -tubulina con los oligonucleótidos universales T1 y Bt2b proporcionó un fragmento de más de 600 pb en todos los monospóricos y aislados analizados, obteniéndose 38 secuencias. Un total de 30 monospóricos fueron identificados como *Pm. aleophilum*, en base a la homología mostrada con diferentes secuencias de esta especie en el análisis BLASTN. Los monospóricos Y271-03-1d e Y549-09-3b mostraron una homología del 100% con las secuencias DQ173105 y FJ517164 de *Pm. viticola* y *Pm. hispanicum*, respectivamente. Los aislados Y270-16-1 e Y277-14-1 fueron identificados como *Pm. mertoniae* y *Pm. iranianum*, respectivamente al presentar una homología del 100% con las secuencias EU863477 y FJ872406. Los monospóricos procedentes de tres aislados tipo del CBS (CBS113065, CBS113585, CBS113593) mostraron elevadas homologías con las especies *Pm. viticola*, *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti*, respectivamente. Pero la secuencia del monospórico CBS222.95b (*Pm. inflatipes*) presentó una elevada homología con secuencias de la especie *Pm. scolyti*.

ii. Alineamiento y filogenia

El alineamiento de las 38 secuencias obtenidas constaba de 652 caracteres, de los cuales 403 fueron constantes y 249 variables. La similitud de las especies del género *Phaeoacremonium* en la región de los exones 2 al 6 de la β -tubulina fue del 61,8%. En las regiones codificantes se encontraron 31 nucleótidos variables, pero correspondieron mayoritariamente a cambios degenerados. El análisis de los aminoácidos mostró en la posición 37 (exón 5) un ácido glutámico en todas las secuencias excepto en la correspondiente al monospórico Y549-09-3b (*Pm. hispanicum*) que contenía ácido aspártico.

Para la reconstrucción filogenética los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. Un total de 20 secuencias adicionales del género *Phaeoacremonium* obtenidas del GenBank fueron incluidas en el análisis NJ (Tabla 3.2.8). Como outgroup se empleó la especie *Pleurostomophora richardsiae*. En el árbol filogenético de tipo NJ se identificaron ocho clados consistentes (100% bootstrap) correspondientes a las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. iranianum*, *Pm. viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. inflatipes*, *Pm. hispanicum*, *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti* (Figura 3.3.13). Cada uno de ellos contenía algunas secuencias de los aislados estudiados junto con secuencias obtenidas de la base de datos, excepto el clado de *Pm. inflatipes*, conformado únicamente por las secuencias AF246805 y AY579322 del GenBank. La secuencia obtenida a partir del aislado tipo de *Pm. inflatipes* (CBS222.95b) se agrupó con las secuencias de *Pm. scolyti* (Figura 3.3.13).

iii. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

Al comparar las secuencias de los 30 cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados, se detectaron seis nucleótidos variables (posiciones T12, T13, T96, T365, T366 y T464), ninguno de ellos en los exones (Tabla 3.3.7).

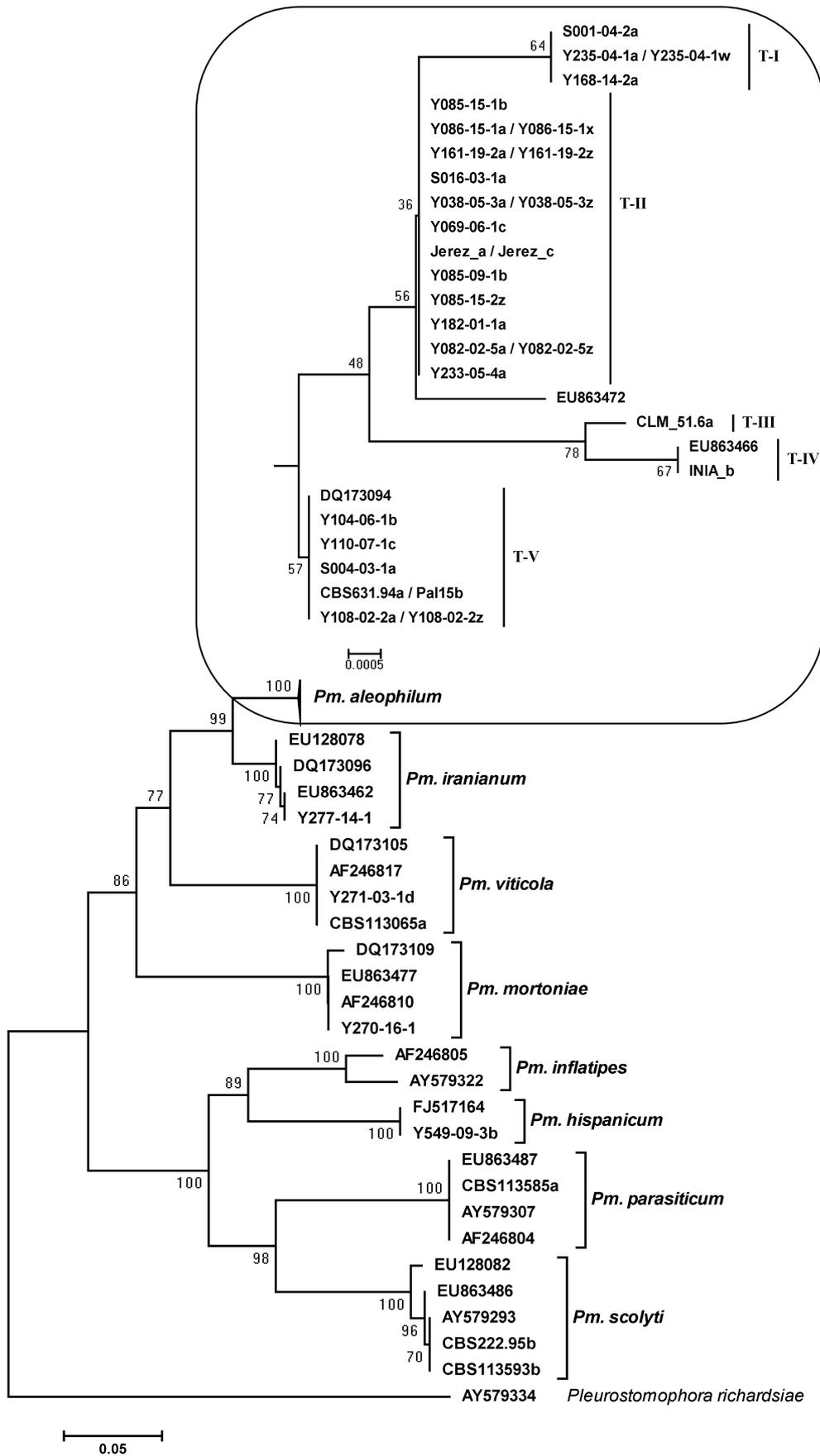


Figura 3.3.13. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la β -tubulina (exones 2 a 6), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

Las diferencias observadas permitieron clasificar los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en cinco grupos genotípicos denominados T-I, T-II, T-III, T-IV y T-V (Figura 3.3.13). Todos los monospóricos presentaron una delección de dos pares de bases en las posiciones T365 y T366, excepto los integrantes de los grupos T-IV y T-V que mostraron adenina y timina. Las posiciones variables y los nucleótidos que caracterizaron cada grupo se muestran en la Tabla 3.3.7.

Tabla 3.3.7. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cinco grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la β -tubulina que contiene los exones del 2 al 6. A: adenina; T: timina, C: citosina, G: guanina. -: ausencia de una base.

Grupo	Posición variable					
	T12	T13	T96	T365	T366	T464
T-I	C	C	A	-	-	G
T-II	C	C	C	-	-	G
T-III	T	A	C	-	-	G
T-IV	T	A	C	A	T	C
T-V	C	C	C	A	T	C

3.3.3.3. β -tubulina, exones 6 a 7

La región comprendida entre el final del exón 6 y el inicio del exón 7 del gen de la β -tubulina ha sido amplificada en especies del género *Phaeoacremonium* por primera vez en este trabajo. Contrariamente a lo observado en las especies de *Cylindrocarpon/Ilyonectria* (apartado 1.3.2.4, Figura 1.3.7), en todos los monospóricos y aislados analizados el tamaño del producto amplificado con los oligonucleótidos universales Bt1a y Bt1b fue mayor de 500 pb.

i. Alineamiento y filogenia

El alineamiento completo de las 38 secuencias obtenidas contenía 521 caracteres, de los cuales 113 fueron variables y 408 constantes. La similitud de las especies del género *Phaeoacremonium* en la región del gen de la β -tubulina que contiene parcialmente los exones 6 a 7 fue del 79,3%. Se encontró una región no codificante entre los exones estudiados, cuya longitud estuvo comprendida entre 53 y 59 pb, dependiendo de las especies. Esta región fue

muy informativa, observándose más de 20 nucleótidos variables entre las siete especies del género incluidas en el análisis. Las secuencias de los 30 monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* fueron idénticas en este intrón. *Pm. iranianum* mostró una similitud del 85,7% con *Pm. aleophilum*. El resto de especies presentaron porcentajes de similitud inferiores en el intrón comprendido entre los exones 6 a 7 del gen de la β -tubulina, al ser comparadas con *Pm. aleophilum*. Los valores estimados fueron de 58,9%, 55,4%, 53,6%, 48,2% y 41% para *Pm. viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. parasiticum*, *Pm. scolyti* y *Pm. hispanicum*, respectivamente.

Al traducir las regiones codificantes se compararon un total de 151 aminoácidos. Se encontraron dos aminoácidos divergentes entre las especies del género *Phaeocremonium*. El monospórico Y549-09-3b (*Pm. hispanicum*) contenía tirosina en la posición 15 del exón 6, mientras los monospóricos de la especie *Pm. viticola* (Y271-03-1d y CBS113065a) contenían serina. Las secuencias proteicas del resto de especies tenían histidina en la posición 15. En la posición 98 del exón 7 se observó arginina en los monospóricos de la especie *Pm. viticola* y lisina en todos los demás.

En el estudio filogenético de la β -tubulina (exones 6 a 7) se incluyeron las secuencias EF445665 y EF445660 del género *Cylindrocarpon/Ilyonectria* como outgroup. Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. El árbol filogenético de tipo NJ fue construido con un total de 32 entradas y permitió definir siete especies dentro del género *Phaeocremonium* (Figura 3.3.14). Solamente los grupos de *Pm. aleophilum*, *Pm. scolyti* y *Pm. viticola* estuvieron bien soportados por valores elevados de remuestreo (99% bootstrap). Esto se debe a que para el resto de especies solamente existía una secuencia.

La secuencia obtenida a partir del aislado tipo de *Pm. inflatipes* (CBS222.95b) se agrupó con la secuencia del aislado tipo de *Pm. scolyti* (CBS113593b).

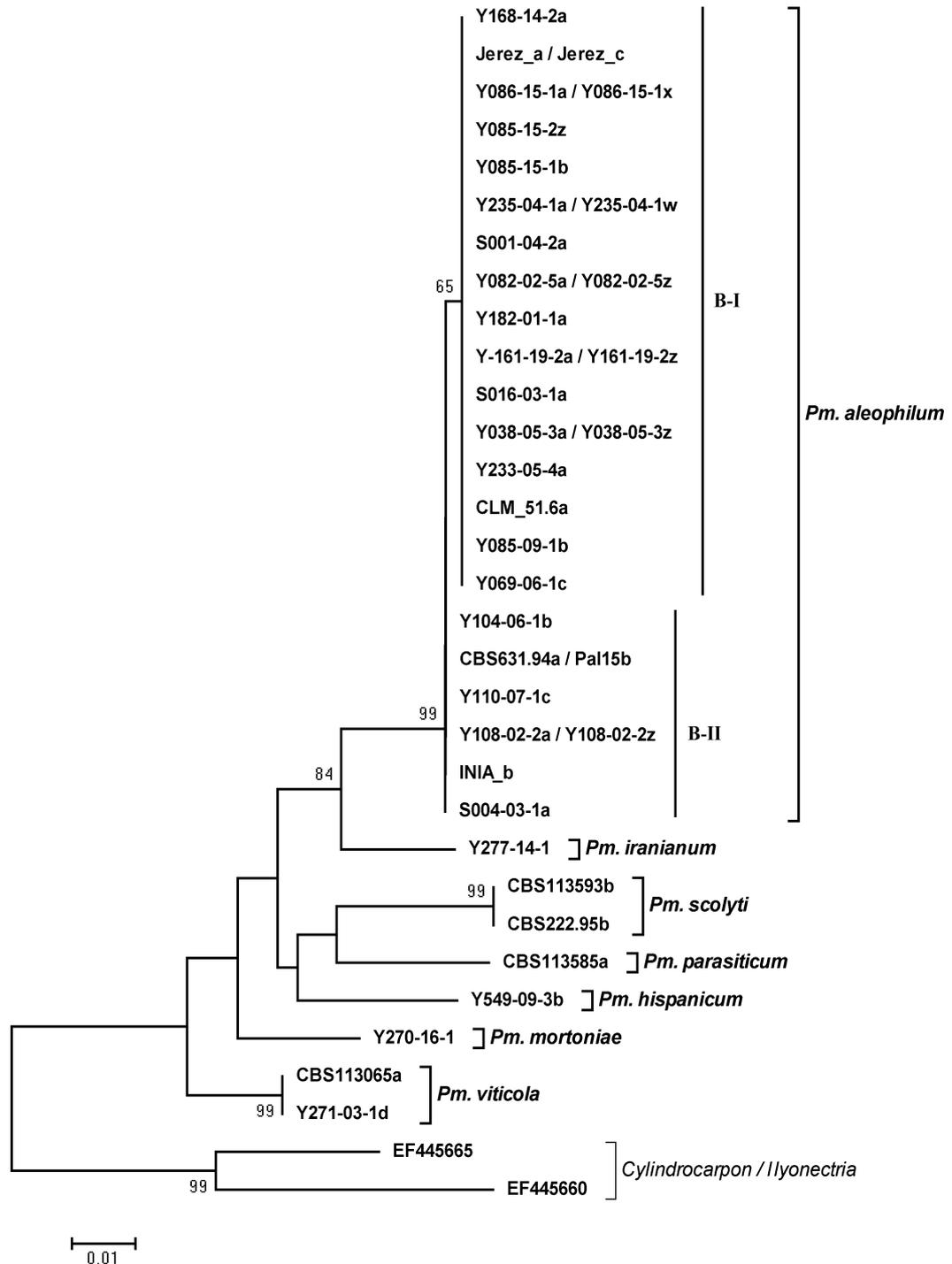


Figura 3.3.14. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la β -tubulina (exones 6 a 7), calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones mayores del 60%.

ii. Variabilidad intra-específica de Pm. aleophilum

La homología en la región de la β -tubulina que contenía parcialmente los exones 6 a 7, fue máxima entre las 30 secuencias comparadas de la especie *Pm. aleophilum*, mostrando un único carácter variable situado en la posición B227. Esta posición variable fue localizada al inicio del exón 7, en una zona codificante y permitió dividir los aislados en dos grupos denominados B-I, cuando presentaron citosina, y B-II para aquellos que presentaron timina (Figura 3.3.14). De modo que los aislados del grupo B-I, poseen el codón CGC y los aislados del grupo B-II el codón CGT. Sin embargo este cambio en la tercera posición no afecta al aminoácido traducido que fue arginina en ambos grupos.

3.3.3.4. Actina

i. Análisis BLASTN

La reacción de PCR desarrollada con los oligonucleótidos iniciadores ACT-512F y ACT-783R permitió amplificar parcialmente el gen de la actina (exones 1 a 3) de todos los monospóricos y aislados analizados. Las 38 secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas previamente en la base de datos del NCBI mediante un análisis de tipo BLASTN. En base a la elevada homología mostrada con secuencias de *Pm. aleophilum*, 30 monospóricos fueron identificados como pertenecientes a esta especie. La secuencia del monospórico Y271-03-1d mostró una homología del 100% con la secuencia DQ173128 de *Pm. viticola*. Para el monospórico Y549-09-3b se obtuvo una homología del 97% con la secuencia FJ517156 de *Pm. hispanicum*. Los aislados Y270-16-1 e Y277-14-1 fueron identificados como *Pm. mortoniae* y *Pm. iranianum*, respectivamente al presentar una homología del 100% con las secuencias DQ173138 y DQ173121.

Los monospóricos procedentes de tres aislados tipo del CBS (CBS113065, CBS113585, CBS113593) mostraron elevadas homologías con las especies *Pm. viticola*, *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti*, respectivamente. Pero la secuencia del monospórico CBS222.95b (*Pm. inflatipes*) presentó mayor homología con secuencias de la especie *Pm. scolyti*.

ii. Alineamiento y filogenia

El alineamiento completo de las 38 secuencias del gen parcial de la actina tuvo una longitud de 270 caracteres, de los cuáles 166 fueron constantes y 104 variables. La similitud de las especies del género *Phaeoacremonium* en el gen de la actina fue del 61,5%.

La traducción de los exones mostró un total de 39 aminoácidos, de ellos dos (situados en el exón 2) fueron variables entre especies del género. En la posición 20 se detectó histidina en todas las especies excepto *Pm. scolyti* que mostró tirosina. En la posición 24 el monospórico Y549-09-3b de la especie *Pm. hispanicum* presentó serina, mientras el aminoácido encontrado en el resto de secuencias fue prolina.

En el análisis filogenético del gen codificante para la actina se incluyeron 20 secuencias de *Phaeoacremonium* spp. procedentes del GenBank y la secuencia AY579271 de *Pleurostomophora richardsiae* como outgroup. Las secuencias de cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratadas como una única entrada. En el árbol filogenético de tipo NJ se identificaron ocho clados consistentes (100% bootstrap) correspondientes a las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. iranianum*, *Pm. viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. inflatipes*, *Pm. hispanicum*, *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti* (Figura 3.3.15). Cada uno de ellos contenía algunas secuencias de los aislados estudiados junto con secuencias obtenidas de la base de datos, excepto el clado de *Pm. inflatipes*, conformado únicamente por las secuencias AY579259 y AY579258 del GenBank.

La secuencia obtenida a partir del aislado tipo de *Pm. inflatipes* (CBS222.95b) se agrupó con las secuencias de *Pm. scolyti* (Figura 3.3.15).

iii. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

Al comparar las secuencias de los 30 monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados, se encontraron tres nucleótidos variables, ninguno localizado en la región codificante. Las posiciones A101 y A122, se situaron entre los exones 1 y 2. La tercera base divergente se localizó en la posición A178, siendo inmediatamente posterior al exón 2.

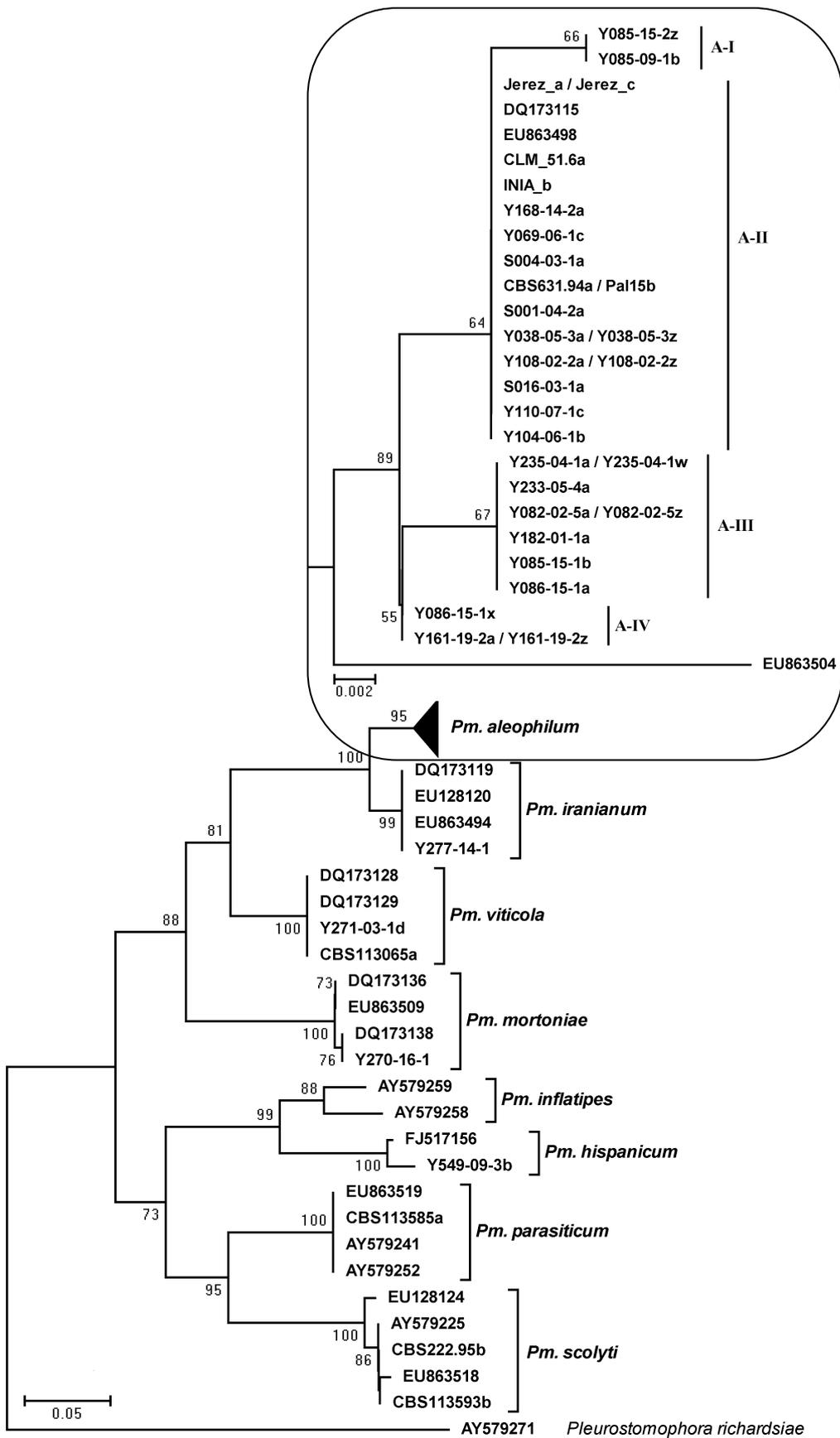


Figura 3.3.15. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la actina, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

Las diferencias obtenidas permitieron clasificar los monospóricos de *Pm. aleophilum* en cuatro grupos genotípicos denominados: A-I, A-II, A-III y A-IV (Figura 3.3.15). La Tabla 3.3.8 muestra las posiciones variables y los nucleótidos que caracterizaron cada grupo intra-específico de *Pm. aleophilum*.

Tabla 3.3.8. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cuatro grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la actina. A: adenina; T: timina, C: citosina, G: guanina.

Grupo	Posición variable		
	A101	A122	A178
A-I	A	G	C
A-II	A	G	A
A-III	C	A	A
A-IV	A	A	A

Los monospóricos Y085-15-2z e Y085-09-1b, integrantes del grupo A-I, mostraron diferencias en los tres caracteres informativos con respecto al monospórico Y085-15-1b, situado en el grupo A-III. Todos ellos procedían de tres aislados diferentes de una misma planta con código Y085 (ver Tabla 3.2.5). Los monospóricos del aislado Y086-15-1 (Y086-15-1a e Y086-15-1x) pertenecieron a grupos diferentes, A-III y A-IV, respectivamente (Figura 3.3.15).

3.3.3.5. Calmodulina

i. Análisis BLASTN

Cuando la reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos CAL-228F y CAL-737R se amplificó un fragmento de ~500 pb en todos los monospóricos y aislados utilizados, excepto el monospórico CBS113585a de la especie *Pm. parasiticum*. En total se obtuvieron 37 secuencias.

Cuando se realizó el análisis BLASTN en búsqueda de homologías con las secuencias disponibles en la base de datos solamente se encontró una homología del 100% para las secuencias de los monospóricos CBS222.95b y CBS113593b con la secuencia AY579275 de *Pm. scolyti*. Las secuencias

restantes presentaron homologías menores del 90% con otras secuencias del género *Phaeoacremonium*.

ii. Alineamiento y filogenia

El alineamiento completo de las 37 secuencias obtenidas contenía 462 caracteres de los cuáles 219 fueron variables y 243 constantes. La similitud encontrada entre especies del género *Phaeoacremonium* en el gen de la calmodulina fue del 52,6%. El alineamiento de los aminoácidos traducidos a partir de las regiones codificantes contenía 46 aminoácidos que fueron idénticos en todas las especies del género.

En el estudio filogenético del gen de la calmodulina se incluyeron las secuencias del GenBank con número de acceso AY579290 y AY579275 pertenecientes a las especies *Pm. inflatipes* y *Pm. scolyti*, respectivamente. Como outgroup se utilizó la secuencia AY745036 de *Phomopsis viticola*. Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. El árbol filogenético de tipo NJ fue construido con un total de 32 entradas y permitió diferenciar seis clados dentro del género *Phaeoacremonium* (Figura 3.3.16).

Las especies *Pm. hispanicum* y *Pm. inflatipes* se agruparon en un mismo clado (99% bootstrap). Los grupos de las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. scolyti* y *Pm. viticola* estuvieron bien soportados por valores elevados de bootstrap (99%). Para el resto de especies solamente existía una secuencia. Las secuencias de los monospóricos CBS222.95b y CBS113593b se agruparon con la secuencia AY579275 de *Pm. scolyti* (99% bootstrap) (Figura 3.3.16).

iii. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

Cuando se compararon las 30 secuencias obtenidas a partir de monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* se detectaron un total de 14 posiciones variables (Tabla 3.3.9). Las diferencias observadas permitieron clasificar los monospóricos de *Pm. aleophilum* en siete grupos genotípicos denominados: C-I, C-II, C-III, C-IV, C-V, C-VI y C-VII (Figura 3.3.16).

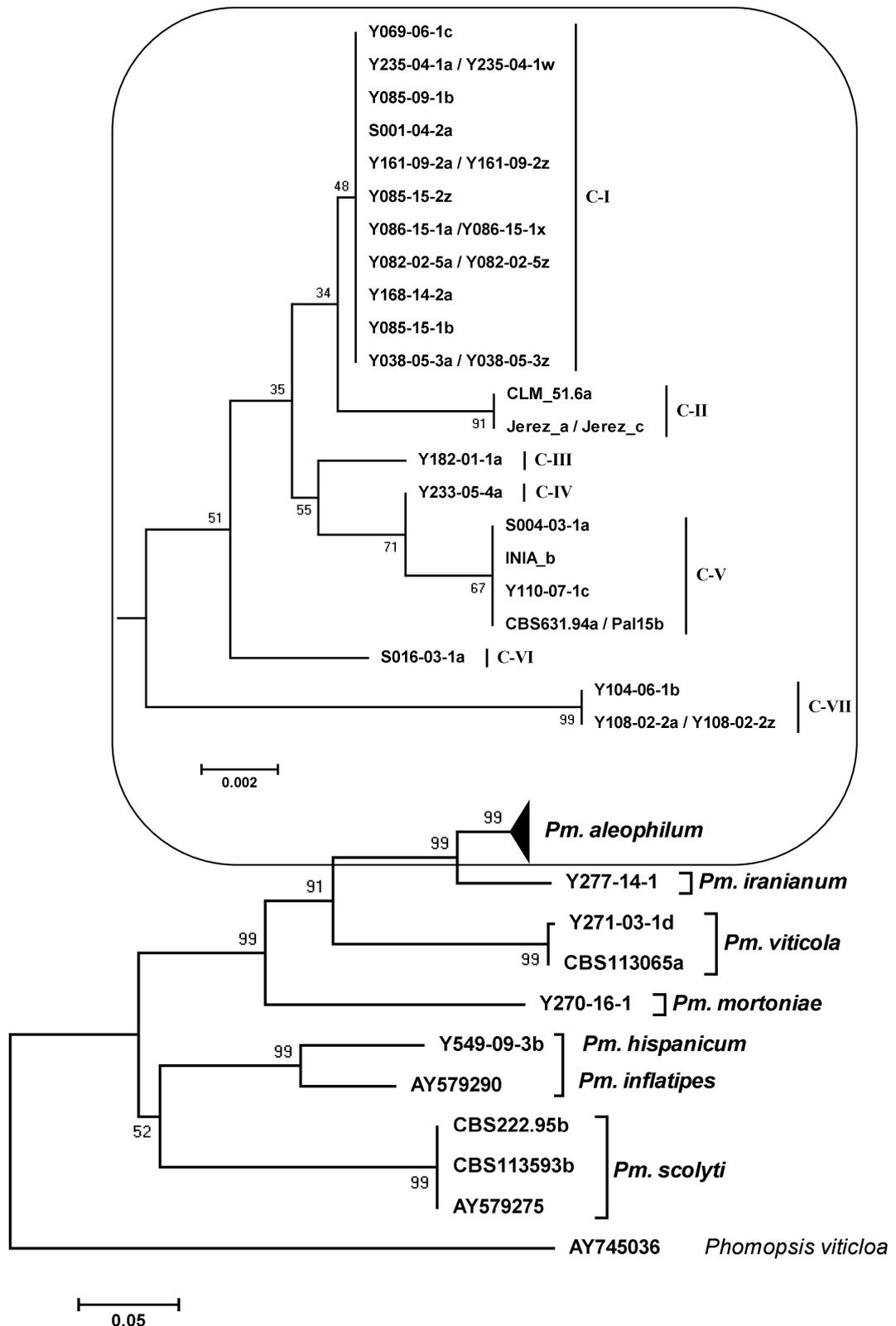


Figura 3.3.16. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen de la calmodulina, calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

La Tabla 3.3.9 muestra las posiciones variables y los nucleótidos que caracterizaron cada uno de los grupos genotípicos de *Pm. aleophilum* diferenciados en la Figura 3.3.16. En la posición C174 se encontró la delección de una guanina en los monospóricos integrantes de los grupos C-IV y C-V. Esta delección fue de nueve nucleótidos en la secuencia del monospórico S016-03-1a (grupo C-VI).

Un total de cuatro posiciones variables, encontradas entre los monospóricos de *Pm. aleophilum*, estuvieron situadas en los exones codificantes (Tabla 3.3.9). Sin embargo, todos los cambios fueron degenerados afectando al tercer nucleótido del codón y no se observaron diferencias en los aminoácidos traducidos.

Tabla 3.3.9. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los siete grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en base al análisis de la secuencia parcial del gen de la calmodulina. A: adenina; T: timina, C: citosina, G: guanina. E1: Exón 1; -: ausencia de una base; *: delección de 9 pb.

Grupo	E1				Posición variable								EXÓN 2		
	C76	C131	C155	C159	C174	C206	C212	C237	C252	C256	C267	C290	C350	C371	
C-I	A	G	C	C	-	A	C	T	C	G	G	A	C	C	
C-II	A	G	C	C	G	G	C	C	C	G	G	A	C	C	
C-III	A	A	C	C	-	A	C	T	C	G	G	A	T	C	
C-IV	C	A	C	C	G	A	C	T	C	G	G	A	C	C	
C-V	C	A	C	A	-	A	C	T	C	G	G	A	C	C	
C-VI	A	A	T	C	-*	A	C	T	C	G	A	A	C	C	
C-VII	A	G	T	C	G	G	T	T	T	A	G	G	C	T	

3.3.3.6. Factor de elongación 1- α (FE1- α)

i. Análisis BLASTN

Utilizando los oligonucleótidos EFE-2F y EFE-3R se amplificó un fragmento de ~ 400 pb en todos los monospóricos y aislados analizados, obteniéndose 38 secuencias que contenían parcialmente los exones 2 y 3 del factor de elongación.

Cuando se realizó el análisis BLASTN de las secuencias obtenidas, se comprobó que el fragmento amplificado en este trabajo contenía ~ 100 pb más que las secuencias previamente depositadas en el GenBank. La comparación de nucleótidos no superó los 300 pb en ninguno de los casos. En base a la elevada homología (99-98%) mostrada con secuencias de *Togninia minima*, 30

monospóricos fueron identificados como pertenecientes a la especie *Pm. aleophilum* especie. La secuencia del aislado Y270-16-1 mostró una homología del 97% con la secuencia AY179913 de *T. fraxinopennsylvanica* (teleomorfo de *Pm. mortoniae*). Para el aislado Y277-14-1 y los monospóricos Y271-03-1d y CBS113065a se obtuvieron homologías del 95% y el 84%, respectivamente, con secuencias de *T. minima*. El resto de secuencias no presentaron homologías significativas al realizar el análisis BLASTN.

ii. Alineamiento y filogenia

El alineamiento completo del gen FE1- α contenía 429 caracteres, de los cuáles 243 fueron constantes y 186 variables. La similitud entre las especies del género *Phaeoacremonium* estudiadas fue del 56,6%. Al traducir los exones 2 y 3 del FE1- α se contabilizaron 37 aminoácidos. Se encontró un aminoácido desigual en la posición 34: prolina en la secuencia del monospórico Y549-09-03b y glicina en el resto de secuencias.

La secuencia EU158820 de *Phaeomoniella chlamydospora* fue incluida como outgroup en el estudio filogenético del gen FE1- α . Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. El árbol filogenético de tipo NJ fue construido con un total de 32 entradas, y permitió diferenciar siete especies dentro del género *Phaeoacremonium* (Figura 3.3.17).

Solamente los grupos de *Pm. aleophilum* (98% bootstrap), *Pm. viticola* y *Pm. scolyti* (99% bootstrap) estuvieron bien soportados por los valores de remuestreo. Para las especies restantes solamente existía una secuencia. La secuencia obtenida a partir del aislado tipo de *Pm. inflatipes* (CBS222.95b) se agrupó con la secuencia del aislado tipo de *Pm. scolyti* (CBS113593b).

iii. Variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

Al comparar las secuencias de los 30 cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados, se detectaron cuatro caracteres variables (posiciones F55, F175, F221 y F246), ninguno de ellos localizado en los exones.

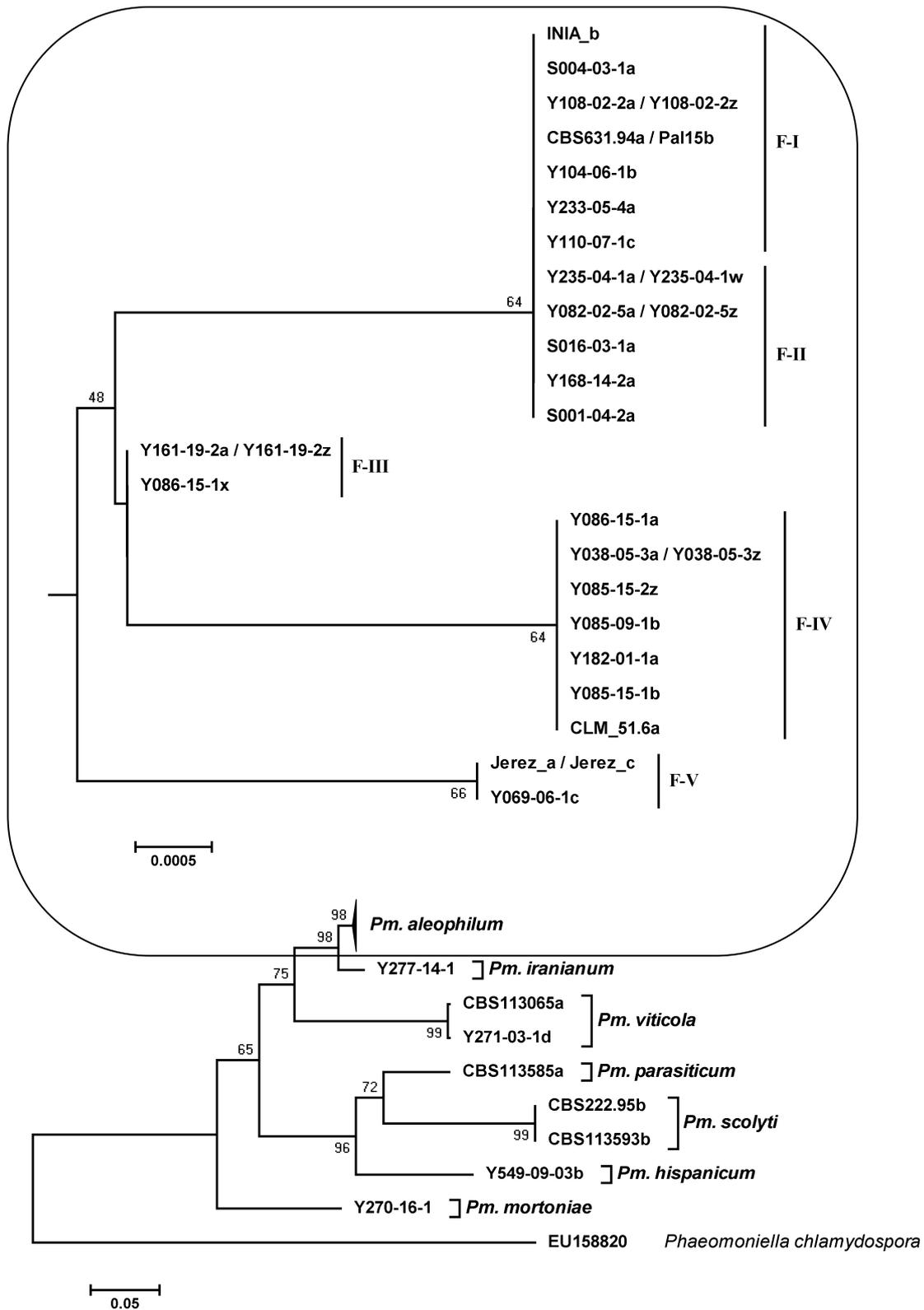


Figura 3.3.17. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen del factor de elongación 1- α , calculadas con el modelo 2-parámetros de Kimura. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

Las diferencias observadas permitieron clasificar los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en cinco grupos genotípicos denominados F-I, F-II, F-III, F-IV y F-V (Figura 3.3.17). Las posiciones variables y los nucleótidos que caracterizaron cada grupo genotípico se muestran en la Tabla 3.3.10.

Las secuencias de los monospóricos clasificados en el grupo F-I, se diferenciaron de los del grupo F-II por la ausencia de citosina en la posición F221 (Tabla 3.3.10). Los monospóricos del aislado Y086-15-1 (Y086-15-1x e Y086-15-1a) pertenecieron a grupos diferentes, F-III y F-IV, respectivamente (Figura 3.3.17).

Tabla 3.3.10. Nucleótidos observados en las posiciones variables de cada uno de los cinco grupos genotípicos en los que fueron divididos los monospóricos de la especie *Pm. aleophilum* en base al análisis de la secuencia parcial del gen FE1- α . A: adenina; T: timina, C: citosina, G: guanina. -: ausencia de una base

Grupo	Posición variable			
	F55	F175	F221	F246
F-I	A	A	-	C
F-II	A	A	C	C
F-III	A	A	C	G
F-IV	A	C	C	G
F-V	T	A	C	G

3.3.3.7. Análisis filogenético completo

El método de máxima verosimilitud (ML), fue utilizado para resumir los resultados obtenidos en la caracterización molecular mediante la amplificación de seis secuencias genómicas del género *Phaeocaremonium*.

Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada. El monospórico CBS222.95b (*Pm. inflatipes*), fue eliminado de este análisis, por presentar secuencias idénticas al monospórico CBS113593b (*Pm. scolyti*) en todas las regiones y tratarse de un cultivo mal identificado (Dr. P. Crous, comunicación personal) o contaminado con *Pm. scolyti* en el laboratorio. Las secuencias del monospórico CBS113585a (*Pm. parasiticum*) también fueron excluidas de este análisis porque no se pudo amplificar la región parcial del gen de la

calmodulina (apartado 3.3.3.5). Por lo tanto, en el análisis filogenético de ML se incluyeron 29 entradas.

El conjunto de datos final estuvo formado por un alineamiento de 2876 caracteres (542 de la región ITS + 652 del gen β -tubulina, exones 2 a 6 + 521 del gen β -tubulina, exones 6 a 7 + 270 del gen actina + 462 del gen calmodulina + 429 del gen FE1- α). De acuerdo con el menor valor de BIC, el modelo evolutivo que mejor describía el patrón de sustitución de los nucleótidos en el conjunto de datos, fue el propuesto por Tamura & Nei (1993), con un 61,6% de sitios invariables (TN93 + I). El modelo TN93 asume dos tasas diferentes de sustitución para las transiciones (adenina \leftrightarrow guanina, timina \leftrightarrow citosina), una tasa distinta de sustitución para las transversiones (guanina \leftrightarrow citosina, adenina \leftrightarrow timina) y además considera la frecuencia con la que aparecen cada uno de los cuatro nucleótidos (Tamura & Nei, 1993).

La Figura 3.3.18 muestra la filogenia evolutiva del género *Phaeoacremonium* inferida utilizando el método de ML con el modelo TN93 + I, dónde se identificaron seis especies (*Pm. aleophilum*, *Pm. iranianum*, *Pm. viticola*, *Pm. mortoniae*, *Pm. hispanicum* y *Pm. scolyti*).

Se encontró una importante variabilidad intra-específica en *Pm. aleophilum*, pero fue difícil establecer grupos intra-específicos consistentes (Figura 3.3.18).

Algunos monospóricos de *Pm. aleophilum* aparecieron agrupados soportados por distintos valores de remuestreo. Los monospóricos Y104-06-1b, Y108-02-2a e Y108-02-2z conformaron un grupo (99% bootstrap). Los monospóricos Y168-14-2a y S001-04-2a se agruparon con un 91% de bootstrap. Otro grupo consistente estuvo formado por los monospóricos CBS631.94a, Pal15b, S004-03-1a, Y110-07-1c e INIA_b (82% bootstrap). Los monospóricos Y085-09-1b e Y085-15-2z también se agruparon (75% bootstrap).

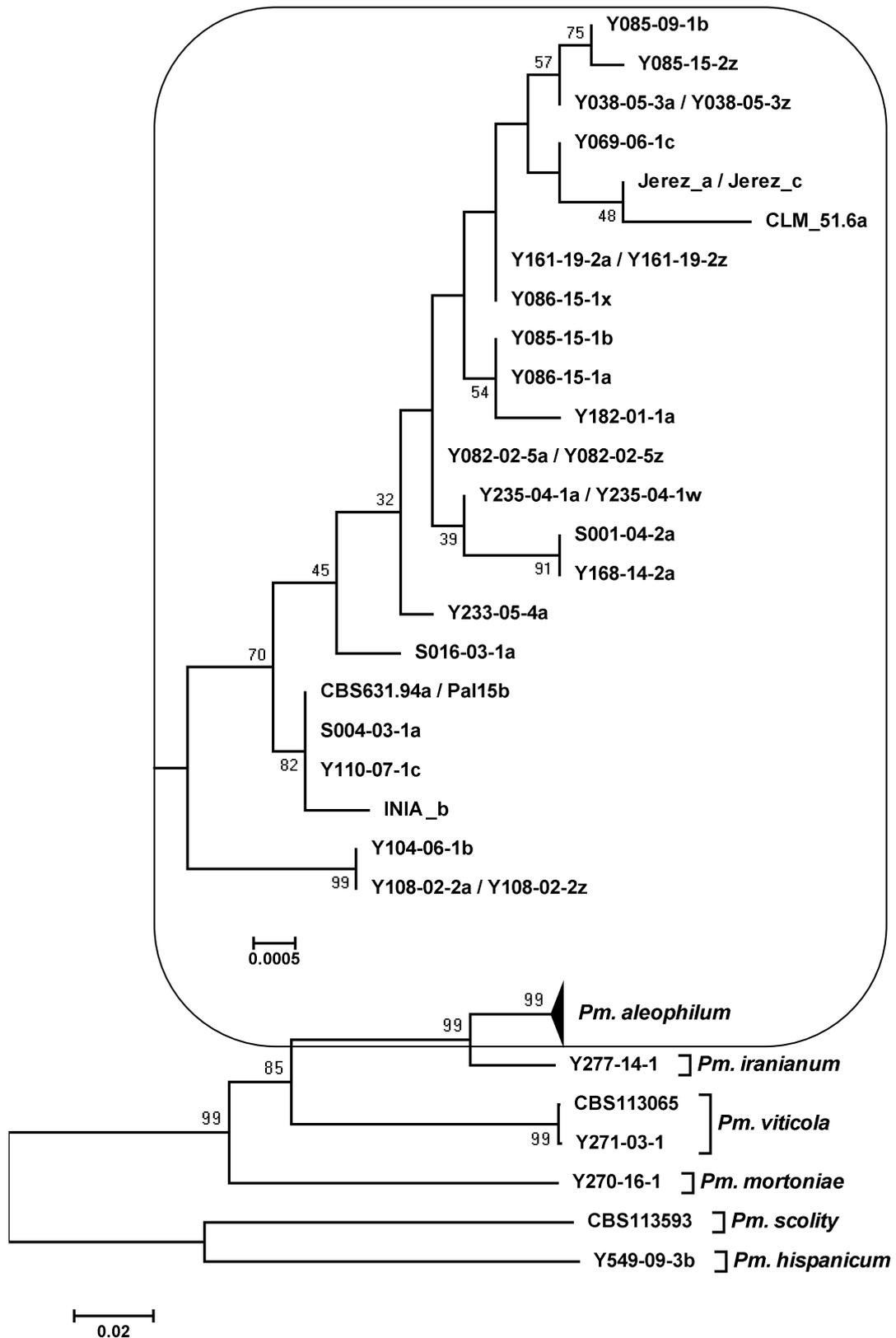


Figura 3.3.18. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo TN93 (Tamura & Nei, 1993) a partir del alineamiento concatenado de la región ITS y los genes parciales de la β -tubulina (exones 2 a 6), β -tubulina (exones 6 a 7), actina, calmodulina y FE1- α . La escala representa el número de sustituciones por sitio. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

3.3.3.8. Nuevas secuencias depositadas en GenBank

Las especies *Pm. viticola*, *Pm. hispanicum* y *Pm. mertoniae*, así como la especie *Pm. iranianum*, han sido detectadas e identificadas por primera vez en Castilla y León y La Rioja-Alavesa, respectivamente, en este trabajo. Las secuencias correspondientes a la región ITS, y los genes parciales de la β -tubulina (exones 2 a 6 y exones 6 a 7), actina, calmodulina y FE1- α , de cada especie, fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 3.3.11.

Tabla 3.3.11. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de cuatro especies de *Phaeoacremonium*.

Especie	Aislado o monospóricico			
	Y271-03-1d	Y549-093b	Y270-16-1	Y277-14-1
	<i>Pm. viticola</i>	<i>Pm. hispanicum</i>	<i>Pm. mertoniae</i>	<i>Pm. iranianum</i>
ITS	JF275864	JF275865	JF275862	JF275863
β -tubulina (exones 2 a 6)	HQ700718	HQ700715	JF275872	JF275873
β -tubulina (exones 6 a 7)	JF275882	JF275883	JF275880	JF275881
Actina	HQ700719	HQ700716	JF275890	JF275891
Calmodulina	HQ700720	HQ700717	JF275908	JF275909
FE1- α	JF275901	JF275900	JF275898	JF275899

3.3.3.9. Análisis intra-específico de *Pm. aleophilum*

i. Diversidad genética

Las secuencias analizadas de *Pm. aleophilum* mostraron un total de 29 caracteres variables: dos en la región ITS, cinco (exones 2 a 6) y uno (exones 6 a 7) en el gen parcial de la β -tubulina, tres en la actina, 14 en la calmodulina y cuatro en el FE1- α . En total se encontraron 17 haplotipos diferentes, en los que fueron clasificados los 30 monospóricicos de *Pm. aleophilum* analizados. El valor de diversidad genética estimado como G/N fue igual a $17/30 = 0,57$. El índice de Shannon normalizado fue de 0,80.

En la caracterización molecular mediante la secuenciación de múltiples genes se eligieron ocho aislados (Y038-05-3, Y082-02-5, Y086-15-1, Y108-02-2, Y161-19-2, Y235-05-4, Jerez y CBS631.94) para los cuáles se estudiaron dos monospóricos distintos (ver Tabla 3.2.5). Los monospóricos de un mismo aislado presentaron secuencias idénticas excepto para el aislado Y086-15-1. Los monospóricos Y086-15-1a e Y086-15-1x mostraron dos nucleótidos diferentes en las posiciones A101 y F175, del gen de la actina y FE1- α , respectivamente.

ii. Diagrama de redes

Se utilizó el programa Network v4.6 para generar un diagrama de redes transformando los 29 caracteres variables encontrados en *Pm. aleophilum* en una matriz de datos binarios. Los cultivos monospóricos procedentes de un mismo aislado con secuencias idénticas, fueron tratados como una única entrada, en total el diagrama constaba de 23 entradas (Figura 3.3.19).

El diagrama de redes permitió visualizar dos grupos dentro de *Pm. aleophilum* (*grupo 1* y *grupo 2*), y mostrar cada una de las diferencias nucleotídicas observadas (Figura 3.3.19).

El primer grupo contenía tres haplotipos diferentes en los que se dispusieron todos los aislados de plantas jóvenes (< 5 años) con enfermedad de Petri (Y104-06-1, Y108-02-2, Y110-07-1 y S004-03-1), junto con los aislados INIA y CBS631.94. Estas agrupaciones fueron previamente establecidas por el análisis filogenético completo con valores de remuestreo > 80% (Figura 3.3.18). Las secuencias parciales de los genes de la calmodulina y la β -tubulina fueron determinantes en la diferenciación del grupo S-I (Figura 3.3.19).

El segundo grupo fue heterogéneo y contenía 14 haplotipos diferentes y un total de 17 entradas. El grupo 2 fue dividido en tres subgrupos (S-II, S-III y S-IV) correlacionados con los resultados obtenidos en los análisis por marcadores moleculares. Aunque el grupo 2 también fue patente en el análisis filogenético completo, Figura 3.3.18 (45% bootstrap), los subgrupos S-II, S-III y S-IV no fueron consistentes.

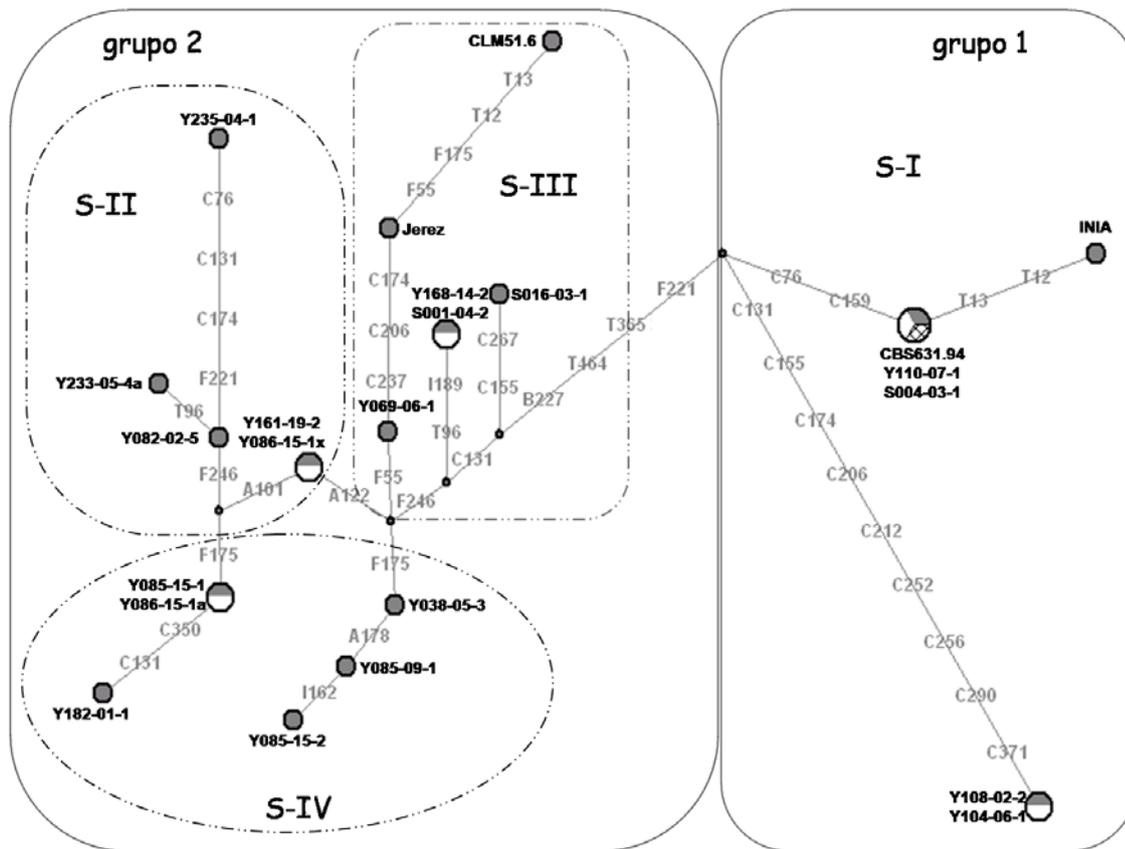


Figura 3.3.19. Diagrama de redes basado en las 29 diferencias de nucleótidos observadas en el análisis múltiple de genes de *Pm. aleophilum*. Sobre las líneas de la red se muestran las posiciones variables con un número precedido por una letra mayúscula que indica el código de la región secuenciada: **A**: actina, **B**: exones 6 a 7 del gen β -tubulina, **C**: calmodulina, **F**: FE1- α , **I**: ITS y **T**: exones del 2 al 6 del gen β -tubulina.

iii. Nuevas secuencias depositadas en GenBank

En función de los grupos y subgrupos establecidos se seleccionaron cuatro monospóricos, cuyas secuencias correspondientes a la región ITS, y los genes parciales de la β -tubulina (exones 2 a 6 y exones 6 a 7), actina, calmodulina y FE1- α fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 3.3.12.

Las secuencias obtenidas en este trabajo a partir de los dos monospóricos del aislado Y086-15-1, que fueron diferentes entre sí, también fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 3.3.13.

Tabla 3.3.12. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de cuatro monospóricos de *Pm. aleophilum*.

Subgrupo	Cultivos monospóricos			
	Y108-02-2	Y235-04-1	Y168-14-2	Y038-05-3
	S-I	S-II	S-III	S-IV
ITS	JF275867	JF275871	JF275870	JF275866
β -tubulina (exones 2 a 6)	JF275879	JF275878	JF275877	JF275874
β -tubulina (exones 6 a 7)	JF275885	JF275889	JF275888	JF275884
Actina	JF275893	JF275897	JF275896	JF275892
Calmodulina	JF275911	JF275915	JF275914	JF275910
FE1- α	JF275903	JF275907	JF275906	JF275902

Tabla 3.3.13. Números de acceso proporcionados por la base de datos Genbank para las distintas regiones secuenciadas de dos monospóricos del aislado Y086-15-1 de *Pm. aleophilum*.

Subgrupo	Aislado Y086-15-1	
	Y086-15-1a	Y86-15-1x
	S-IV	S-II
ITS	JF275868	JF275869
β -tubulina (exones 2 a 6)	JF275875	JF275876
β -tubulina (exones 6 a 7)	JF275886	JF275887
Actina	JF275894	JF275895
Calmodulina	JF275912	JF275913
FE1- α	JF275904	JF275905

iv. Comparación de matrices de distancia

Con la matriz binaria de los 29 caracteres variables encontrados entre las secuencias de *Pm. aleophilum* se calcularon dos matrices de distancia. La primera basada en el índice de identidad de Jaccard (IJ_{xy}) y la segunda basada en la proporción normalizada de bandas compartidas (Q_{xy}). Posteriormente las matrices obtenidas fueron comparadas mediante un test de Mantel con las

matrices de distancias obtenidas a partir del análisis de los marcadores moleculares (RAPD, apartado 3.3.1.2 y AFLP, apartado 3.3.2.1). Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.3.14.

Tabla 3.3.14. Valores de ajuste R , obtenidos al comparar las matrices de distancia resultantes de los análisis de caracterización intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante el test de Mantel. N: número de cultivos monospóricos compartidos entre las técnicas empleadas.

	RAPD-AFLP N=17	RAPD-SECUENCIAS N=30	AFLP-SECUENCIAS N=17
1-IJ_{xy}	0,6294	0,3873	0,6624
1-Q_{xy}	0,5931	0,3624	0,6460

La menor correlación fue encontrada al comparar los resultados de RAPD y la secuenciación múltiple de genes (Tabla 3.3.14). Los resultados obtenidos con la técnica AFLP estuvieron mejor correlaciones con los obtenidos mediante la técnica RAPD y mediante el análisis de múltiples secuencias ($R \approx 0,6$).

3.3.4. Caracterización morfológica y fenotípica

Los resultados obtenidos al observar los caracteres morfológicos de las distintas especies de *Phaeoacremonium* incluidas en la colección del ITACyL se describen a continuación.

3.3.4.1. *Phaeoacremonium viticola*

El aislado Y271-03-1 y sus monospóricos presentaron caracteres morfológicos similares al aislado tipo CBS113065. La tasa de crecimiento en medio PDA fue de $4,13 \pm 0,18$ mm transcurridas dos semanas. La coloración superficial del micelio fue inicialmente de color blanco amarillento, con margen entero. Después de tres semanas el micelio aéreo se tornó rojo violáceo (Figura 3.3.20), más oscuro en el reverso de la placa. Los conidios fueron hialinos, aseptados y reniformes, con un tamaño de $3-5,2 \times 1,25-2 \mu\text{m}$ ($4,0 \times 1,5 \mu\text{m}$ de media). El cociente promedio L/W calculado fue de 3,03.

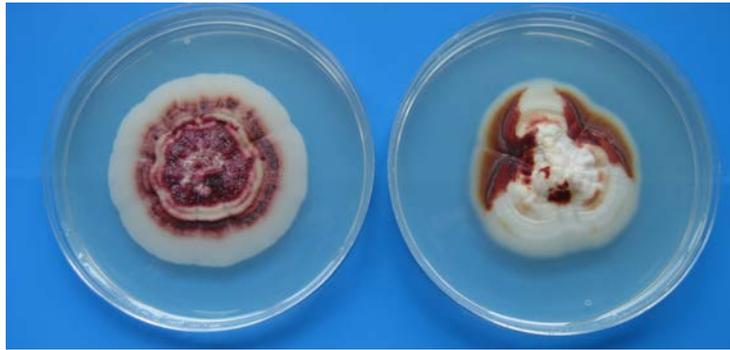


Figura 3.3.20. Aspecto morfológico del aislado Y271-03-1 identificado como *Pm. viticola* en medio PDA, transcurridas seis semanas.

3.3.4.2. *Phaeoacremonium hispanicum*

El aislado Y549-09-3 y sus monospóricos mostraron una tasa de crecimiento en medio PDA de $10,71 \pm 0,38$ mm transcurridas dos semanas. En la primera semana de crecimiento el micelio presentó una coloración marrón blanquecina con margen entero. Después de tres semanas el micelio aéreo se tornó de color miel, marrón oscuro (Figura 3.3.21). En el reverso de la placa el color observado también fue marrón. Los conidios fueron hialinos, oblongos, elipsoidales, con un tamaño de $4-5,7 \times 1,5-2,5$ μm ($4,5 \times 2$ μm de media). El cociente promedio L/W calculado fue de 2,33.

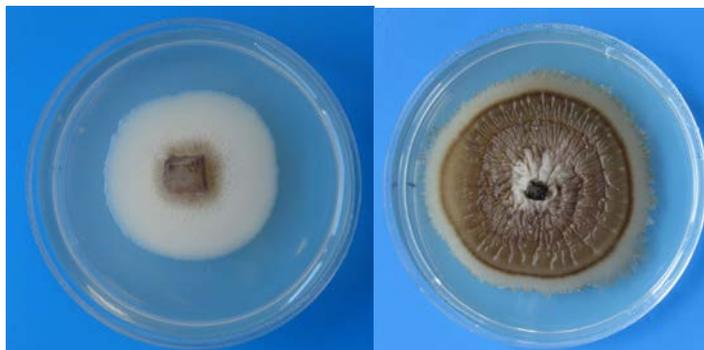


Figura 3.3.21. Aspecto morfológico del aislado Y549-09-3 identificado como *Pm. hispanicum* en medio PDA. Transcurridas tres semanas (izquierda) y seis semanas (derecha).

3.3.4.3. *Phaeoacremonium mortoniae*

El aislado Y270-16-1 mostró una coloración inicialmente blanquecina, que tornó a amarillo grisáceo posteriormente. De color gris claro en el reverso de la placa. Los conidios fueron elipsoidales o reniformes, de tamaño $3-4$ μm x $1-1,5$ μm ($3,8 \times 1$ μm de media). El cociente promedio L/W calculado fue de 3,9.

3.3.4.4. *Phaeoacremonium iranianum*

El aislado Y277-14-1 presentó un color marrón pálido al inicio que posteriormente tornó a una coloración gris anaranjada. De color marrón en el reverso de la placa. Los conidios fueron hialinos, elipsoidales, de tamaño 3-4,5 x 1-2 μm (4 x 1,5 μm de media). El cociente promedio L/W calculado fue de 2,8.

3.3.4.5. *Phaeoacremonium aleophilum*

En la coloración aérea del micelio se observaron dos grandes grupos de aislados de *Pm. aleophilum*. Unos presentaron un color beige que a veces evolucionaba hacia tonos marrón claro (Figura 3.3.22 A y B). Los otros presentaron una coloración gris-ocre con coloraciones marrones (Figura 3.3.22 C y D). Los conidios observados fueron hialinos, oblongos o cilíndricos, de tamaño 4,5 x 1,5, y una relación L/W de 3,0.

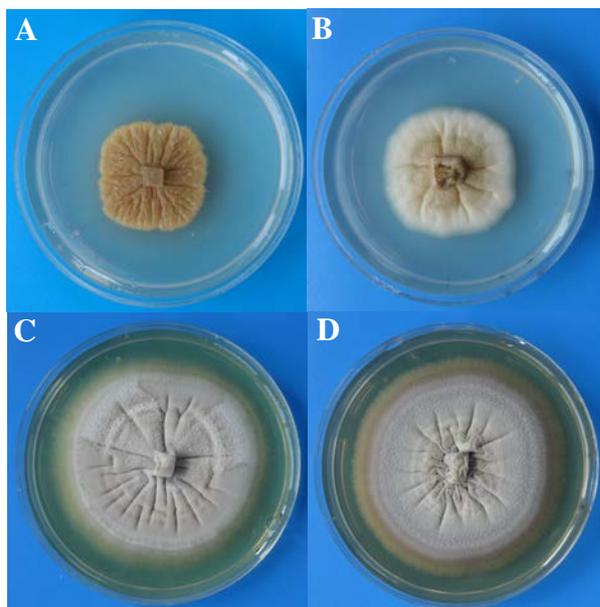


Figura 3.3.22. Aspecto morfológico de distintos aislados de *Pm. aleophilum* en medio PDA, transcurridas seis semanas.

A y B: Aislados del grupo 1 (INIA_b e Y108-02-2a).

C y D: Aislados del grupo 2 (Y235-04-1b e Y086-15-1a).

Se estudiaron diferentes caracteres morfológicos (tasa de crecimiento, \log_{10} de los conidios producidos por ml, longitud, anchura y relación L/W de los conidios, color reverso de la placa medido en unidades CIE $L^* a^* b^*$ y la tinción amarilla del medio PDA) en 33 monospóricos de *Pm. aleophilum*

(Tabla 3.2.5). Los datos fenotípicos fueron explorados mediante un análisis multivariante de componentes principales (Figura 3.3.23).

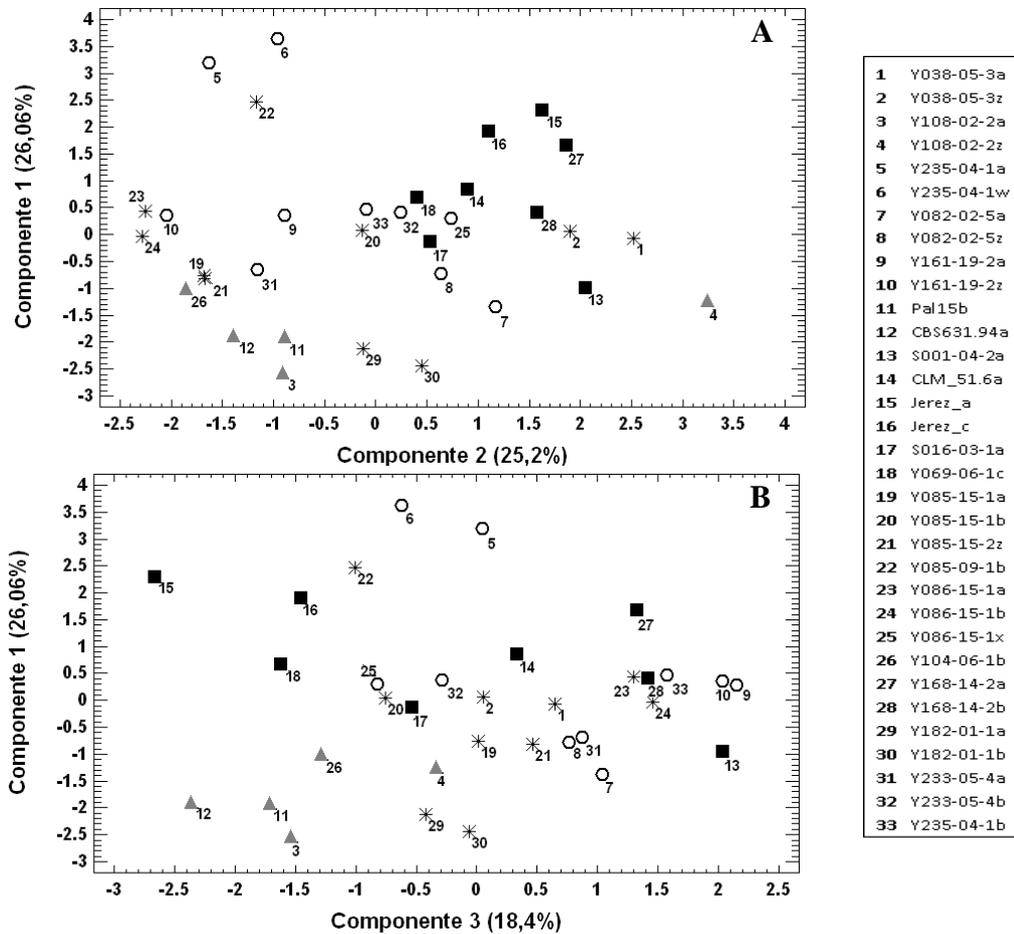


Figura 3.3.23. Proyección de los 33 monospóricos de *Pm. aleophilum* caracterizados fenotípicamente sobre el plano de los componentes principales. A: Proyección sobre el plano del primer y segundo componente principal. **B:** Proyección sobre el plano del primer y tercer componente principal. Los triángulos representan los monospóricos de aislados integrantes del grupo S-I (correspondencia con R-I y A-I). Los círculos representan los monospóricos de aislados clasificados en el grupo S-II (correspondencia con R-II y A-II). Los cuadrados representan los monospóricos de los aislados integrantes del grupo S-III (correspondencia con R-III y A-II). Los asteriscos representan los monospóricos clasificados en el grupo S-IV (correspondencia con R-IV y A-III).

Los tres componentes principales explicaron el 69,66% de la variabilidad total. El primer componente explicó el 26,06% de la variabilidad, el segundo componente el 25,2% y el tercero el 18,4% de la variabilidad total.

Las variables con mayor influencia en el primer componente principal fueron el tamaño de los conidios y la tasa de crecimiento (Tabla 3.3.15 y Figura 3.3.24). Los monospóricos CBS631.94a, Pal15b, Y108-02-2a, Y108-02-

2z e Y104-06-1b (grupos R-I, A-I y S-I) se situaron en la parte inferior del eje del componente 1 (triángulos en la Figura 3.3.23), porque presentaron un menor tamaño de los conidios y un crecimiento significativamente menor que el resto de monospóricos estudiados (Tabla 3.3.16).

La variable con mayor influencia en el segundo componente principal fue la coloración del reverso de la colonia medida con un colorímetro en el sistema CIE $L^* a^* b^*$ (Tabla 3.3.15 y Figura 3.3.22 A). Los monospóricos S001-04-2a, CLM_51.6a, Jerez_a, Jerez_c, S016-03-1a, Y69-06-1c, Y168-14-2a y Y168-14-2b (grupos R-III, A-II y S-III), se situaron en la parte derecha del eje del segundo componente (cuadrados en la Figura 3.3.23 A). En promedio, estos aislados presentaron valores significativamente mayores de luminosidad (L^*) y rojo-verde (b^*), pero significativamente inferiores de amarillo-azul (a^*) que los demás monospóricos estudiados (Tabla 3.3.16).

Tabla 3.3.15. Peso de las variables fenotípicas analizadas en los tres componentes principales extraídos del análisis multivariante. Crecimiento_2: tasa de crecimiento (mm) a las dos semanas. Log_Esp_2: \log_{10} de los conidios producidos por ml después de dos semanas. L^*_4 , a^*_4 y b^*_4 : Color del reverso de la colonia tras cuatro semanas de crecimiento. Longitud_L: longitud media de 10 conidios, Anchura_W: anchura media de 10 conidios. L/W: relación entre la longitud y anchura de 10 conidios. Pigmentación_4: Producción de pigmentación amarilla en medio PDA, después de cuatro semanas.

Variab les	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Crecimiento_2	0.203844	0.056871	0.55928
Log_Esp_2	-0.176592	-0.051473	-0.462598
L^*_4	0.124491	0.614108	0.0376125
a^*_4	-0.041343	-0.469239	-0.0010280
b^*_4	0.148505	0.566	-0.0198696
Longitud_L	0.534684	-0.145165	0.0534338
Anchura_W	0.620061	-0.123006	-0.185924
L/W	-0.459002	0.0674057	0.343449
Pigmentación_4	0.0834046	-0.188944	0.562155

Las variables con mayor influencia en el tercer componente fueron la tasa de crecimiento, la producción de conidios y la tinción del medio PDA (Tabla 3.3.15 y Figura 3.3.24 B). En la Figura 3.3.23 B, se observa que los monospóricos clasificados en los grupos R-I, A-I y S-I (CBS631.94a, Pal15b, Y108-02-2a, Y108-02-2z e Y104-06-1b), se situaron en la parte derecha del eje del componente 3 (triángulos en la Figura 3.3.23 B). También se proyectaron en esa región los monospóricos Jerez_a, Jerez_c y Y69-06-1c (grupos R-III, A-

II y S-III, cuadrados en la Figura 3.3.23 B), porque presentaron una menor tasa de crecimiento y nunca tiñeron el medio PDA de amarillo. Además todos éstos monospóricos se caracterizaron por pertenecer al primer grupo descrito en la observación del micelio (coloración beige, a veces marrón).

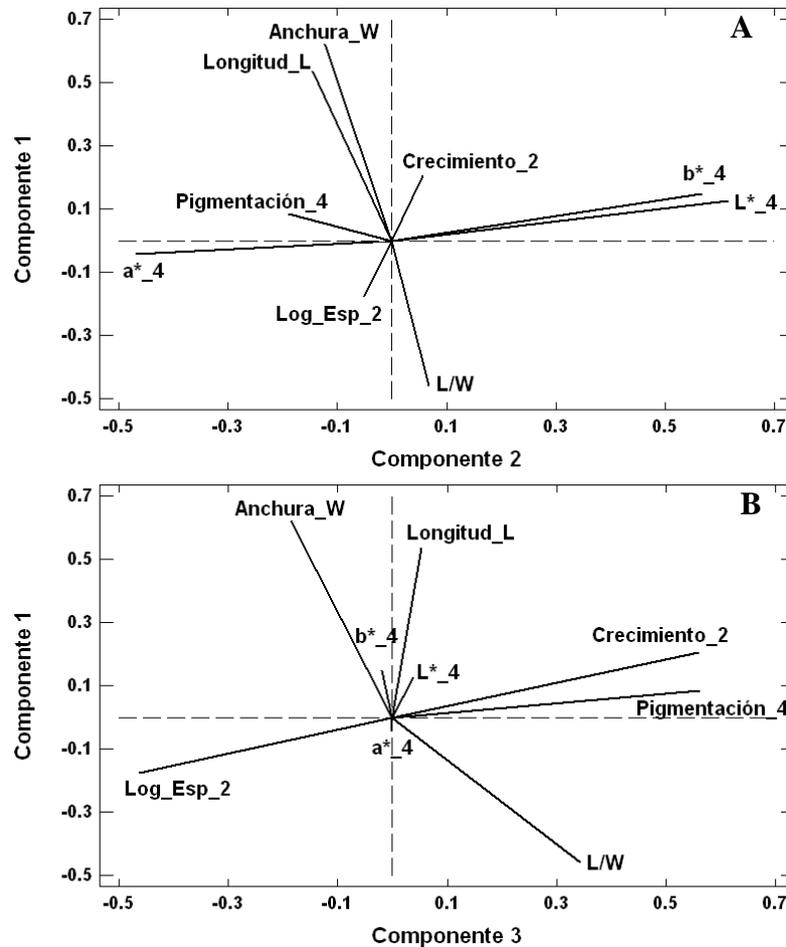


Figura 3.3.24. Proyección de las variables analizadas sobre el plano de los componentes principales. A: Proyección sobre el plano del primer y segundo componente principal. **B:** Proyección sobre el plano del primer y tercer componente principal. Crecimiento_2: tasa de crecimiento (mm) a las dos semanas. Log_Esp_2: \log_{10} de los conidios producidos por ml después de dos semanas. L*_4, a*_4 y b*_4: Color del reverso de la colonia tras cuatro semanas de crecimiento. Longitud_L: longitud media de 10 conidios, Anchura_W: anchura media de 10 conidios. L/W: relación entre la longitud y anchura de 10 conidios. Pigmentación_4: Producción de pigmentación amarilla en medio PDA, después de cuatro semanas.

Los resultados de la caracterización fenotípica de *Pm. aleophilum* manifestaron una importante variabilidad intra-específica. No obstante, no permitieron establecer grupos consistentes.

La Tabla 3.3.16 muestra los resultados medios de las variables fenotípicas evaluadas en este trabajo, para cada uno de los grupos intra-específicos encontrados en los análisis de la caracterización molecular.

Los resultados del análisis ANOVA mostraron un efecto significativo ($P < 0,01$) del grupo intra-específico sobre las siguientes variables: tasa de crecimiento micelial a las dos semanas, longitud y anchura de los conidios, y coloración del reverso de la colonia (medida en el sistema CIE $L^* a^* b^*$) a las cuatro semanas.

Tabla 3.3.16. Resumen de la caracterización fenotípica de *Pm. aleophilum* y su correlación con los grupos intra-específicos encontrados en los análisis de caracterización molecular (RAPD, AFLP y secuenciación de múltiples genes). Todos los datos son valores medios de las seis repeticiones (3 réplicas x dos experimentos) calculados a partir del número de monospóricos (N) que conformaba cada grupo. ^a: Resultados del análisis ANOVA. Los valores seguidos por una letra distinta difieren significativamente de acuerdo con el test LSD ($P < 0,01$).

Grupo	Crecimiento ^a	Longitud (μm) ^a	Anchura (μm) ^a	L/W ^a
R-I, A-I, S-I (N = 5)▲	5.96±0.22a	4.3±0.12a	1.5±0.05a	3.0±0.07a
R-II, A-II, S-II (N = 10)○	8.13±0.14b	4.7±0.11ab	1.8±0.07b	2.7±0.06a
R-III, A-II, S-III (N = 8)■	7.78±0.24b	4.8±0.10b	1.8±0.07b	2.8±0.08a
R-IV, A-III, S-IV (N = 10)*	7.75±0.21b	4.6±0.10ab	1.7±0.06ab	2.9±0.05a
Grupo	Conidios (log ₁₀) ^a	L* ₄ ^a	a* ₄ ^a	b* ₄ ^a
R-I, A-I, S-I (N = 5)▲	7.03±0.11a	30.47±1.27a	1.26±0.20a	6.18±0.71a
R-II, A-II, S-II (N = 10)○	6.90±0.05a	33.44±0.94a	0.87±0.14ab	7.83±0.60a
R-III, A-II, S-III (N = 8)■	6.95±0.06a	39.90±0.78b	0.40±0.13b	11.51±0.37b
R-IV, A-III, S-IV (N = 10)*	7.07±0.03a	32.14±1.07a	0.90±0.11a	7.10±0.53a

3.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se han caracterizado fenotípica y molecularmente todas las especies de *Phaeoacremonium* aisladas e identificadas en nuestro laboratorio. Las características observadas en PDA, en combinación con los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de seis fragmentos de ADN, demuestran la presencia de *Pm. aleophilum*, *Pm. viticola*, *Pm. hispanicum* y *Pm. mortoniae* en viñedos de Castilla y León. *Phaeoacremonium iranianum* ha sido encontrado por primera vez en una planta adulta con síntomas de yesca en la Rioja Alavesa. Los caracteres morfológicos evaluados para cada una de estas cinco especies concuerdan con las descripciones realizadas por otros autores (Groenewald *et al.*, 2001; Dupont *et al.*, 2002; Mostert *et al.*, 2006a; Gramaje *et al.*, 2009b).

Algunos trabajos han puesto de manifiesto la dificultad extrema para identificar el complejo de *Phaeoacremonium* spp. asociadas con los decaimientos de la vid utilizando únicamente caracteres morfológicos (Groenewald *et al.*, 2001). Por ello la secuenciación parcial de genes ha jugado un papel importante en la identificación de los aislados de *Phaeoacremonium* durante los últimos años.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la región ITS no fue suficientemente informativa para discriminar todas las especies del género *Phaeoacremonium* estudiadas, especialmente *Pm. iranianum* y *Pm. hispanicum*. Así el mayor porcentaje de identidad o similitud entre las especies del género (83,6%) se correspondió con esta región. Groenewald *et al.* (2001) también encontraron dificultades para diferenciar *Pm. aleophilum* y *Pm. angustius* basándose en la secuencia de la región ITS.

Los exones 2 a 6 del gen de la β -tubulina y 1 a 3 del gen de la actina demostraron ser altamente informativos ya que permitieron identificar claramente todas las especies analizadas. El elevado número de secuencias de estas regiones depositadas previamente en la base de datos por otros autores, facilitó este hallazgo y permitió obtener buenos resultados en el soporte de los análisis filogenéticos (Figuras 3.3.13 y 3.3.15). La similitud de

Phaeoacremonium spp. fue de 61,8% y 61,5% para el gen de la β -tubulina (exones 2 a 6) y de la actina, respectivamente.

Sin embargo, en este trabajo los menores valores de similitud entre especies del género *Phaeoacremonium* fueron los obtenidos al comparar las secuencias de la calmodulina y el FE1- α (52,6% y 56,6%, respectivamente). Estos datos indicaron que los genes de la calmodulina y el FE1- α son los más útiles en la diferenciación de las distintas especies del género. Las condiciones de PCR empleadas en este trabajo, con los oligonucleótidos CAL-228F y CAL-737R, no permitieron amplificar los exones 1 a 3 del gen de la calmodulina en la especie *Pm. parasiticum*. Y se hace necesario mejorar las condiciones de amplificación o promover el diseño de nuevos oligonucleótidos.

Respecto al FE1- α , la utilización del par de oligonucleótidos EFE-2F y EFE-3R, propuestos por Cobos & Martín (2008) para amplificar los exones 2 y 3 del factor de elongación 1- α de *Pa. chlamyospora*, demostraron ser una herramienta muy útil para el estudio de esta región en *Phaeoacremonium* spp., porque proporcionaron un fragmento de ADN mucho mayor (> 400 pb) al obtenido por otros autores con los oligonucleótidos EF1-728F y EF1-986R (250-300 pb) (Mostert *et al.*, 2003).

Los exones 6 a 7 del gen de la β -tubulina han sido analizados en especies del género *Phaeoacremonium* por primera vez en este estudio. No se encontraron marcadores especie-específicos, como la inserción de 52 pb descrita por Petit & Gubler (2005) y útil en la diferenciación de especies del género *Cylindrocarpon* (*Ilyonectria*, en la actualidad). Todas las especies de *Phaeoacremonium* analizadas presentaron una inserción de longitud variable (53 a 59 pb) entre los exones 6 a 7 del gen de la β -tubulina. Esta región resultó ser poco informativa (78,3% de similitud). Sin embargo, la comparación de la secuencia de aminoácidos permitió caracterizar los aislados de *Pm. viticola*, que mostraron dos aminoácidos diferentes respecto del resto de las especies estudiadas.

Un total de 60 nuevas secuencias fueron depositadas en la base de datos GenBank (Tablas 3.3.11, 3.3.12 y 3.3.13). Aunque las secuencias de la región ITS fueron insuficientes para identificar de forma definitiva todas las especies del género *Phaeoacremonium*, también fueron introducidas en el GenBank, por

considerar que proporcionan una información valiosa. Así, por ejemplo, la secuencia JF275865, es la primera secuencia ITS de la especie *Pm. hispanicum* disponible en la base de datos. De modo similar, la caracterización molecular mediante secuenciación de múltiples genes, ha permitido depositar por primera vez secuencias que contienen los exones 6 a 7 del gen de la β -tubulina y el gen parcial de la calmodulina (exones 1 a 3) para las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. viticola*, *Pm. hispanicum*, *Pm. mortoniae* y *Pm. iranianum*. Antes de la realización de este estudio existían en la base de datos secuencias del FE1- α de algunas especies de la forma teleomórfica (*Togninia*). Gracias al presente trabajo esta información ha sido ampliada mediante la introducción de 10 nuevas secuencias en el GenBank, de mayor longitud, correspondientes al FE1- α de cinco especies del género *Phaeocremonium*. La información de todas estas secuencias puede ser útil en el diseño de nuevos métodos de identificación especie-específicos.

Los marcadores moleculares pueden ser también una poderosa herramienta para discriminar las especies del género *Phaeocremonium*. En este trabajo se ha llevado a cabo una primera aproximación de la utilidad de la técnica RAPD para conseguir este objetivo. El análisis inter-específico de RAPD proporcionó 131 bandas de intensidad uniforme y altamente reproducibles. Aunque la reproducibilidad de esta técnica entre laboratorios ha sido cuestionada, lo cierto es que en este trabajo se han encontrado bandas citadas anteriormente por otros autores (Péros *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2002).

La caracterización molecular de *Phaeocremonium* spp. utilizando marcadores de tipo RAPD mostró la existencia de bandas exclusivas en *Pm. aleophilum*, *Pm. viticola*, *Pm. parasiticum* y *Pm. scolyti*. Los patrones de bandas obtenidos permitieron diferenciar cuatro de las cinco especies de *Phaeocremonium* incluidas en este análisis. Los monospóricos procedentes de los aislados CBS222.95 (*Pm. inflatipes*) y CBS113593 (*Pm. scolyti*) fueron prácticamente idénticos, sugiriendo que ambos aislados pertenecían a la misma especie. Los resultados obtenidos en la caracterización molecular mediante el análisis de secuencias identificaron ambos aislados como *Pm. scolyti*. En el año 2000, Tegli *et al.* sugirieron que el aislado CBS222.95 no había sido identificado correctamente y encontraron una elevada homología de este

aislado con la especie *Pm. aleophilum*. A la luz de los resultados obtenidos se ha informado al CBS de la posible identificación incorrecta del aislado CBS222.95, aunque la contaminación con *Pm. scolyti* puede haber ocurrido durante la realización de este estudio.

En la última década, diferentes especies del género *Phaeoacremonium* han sido asociadas con la enfermedad de Petri y la yesca en Francia (Larignon & Dubos, 1997; Dupont *et al.*, 2000), Italia (Mugnai *et al.*, 1999; Essakhi *et al.*, 2008), Alemania (Fischer & Kassemeyer, 2003), Australia (Edwards & Pascoe, 2004) y España (Gramaje *et al.*, 2009a y 2009b). Mientras la enfermedad de eutipiosis se atribuye a la presencia de *Eutypa lata* en todo el mundo (Carter *et al.*, 1976; Péros & Berger, 2003; Trouillas *et al.*, 2004; Lardner *et al.*, 2005; Muruamendiaraz y Legorburu, 2009).

Como se ha visto en el Capítulo 1 de esta memoria, en Castilla y León *Phaeoacremonium* spp. también ha sido aislado de plantas con síntomas de eutipiosis. De hecho, el valor medio de aislados de *Phaeoacremonium* spp. fue mayor en plantas con sintomatología de eutipiosis (3,1) que en plantas con síntomas de yesca (2,4). Las plantas jóvenes con síntomas de la enfermedad de Petri, mostraron un valor (1,4) similar al de las plantas asintomáticas (1,7) (Tabla 3.2.1). Dentro del género *Phaeoacremonium*, *Pm. aleophilum* fue la especie mayoritariamente aislada en Castilla y León (95%). Este dato corrobora el supuesto de que *Pm. aleophilum* es la especie del género más común en España (Armengol *et al.*, 2001; Martín & Cobos, 2007; Sánchez-Torres *et al.*, 2008) y concuerda con lo obtenido en otras zonas vitivinícolas del mundo (Dupont *et al.*, 2002; Essakhi *et al.*, 2008).

En este capítulo la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* ha sido analizada mediante la caracterización fenotípica y molecular de un conjunto de monospóricos. La caracterización morfológica mostró la existencia de una importante variabilidad intra-específica en *Pm. aleophilum*. La tasa de crecimiento, la coloración del micelio aéreo y del reverso de la placa, y la producción de pigmentación amarilla en PDA fueron las variables que más contribuyeron a la separación de los monospóricos analizados en el análisis PCA. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron discriminar grupos consistentes.

La caracterización molecular de 30 *Pm. aleophilum* mediante el análisis de seis secuencias de ADN, mostró 29 posiciones variables y determinó la existencia de 17 haplotipos diferentes. La diversidad genética de *Pm. aleophilum* fue de 0,57 y el índice de Shannon normalizado de 0,80 (Tabla 3.4.2).

El análisis conjunto de todas las secuencias permitió establecer dos grandes grupos dentro de *Pm. aleophilum*. El primer grupo (grupo 1) estuvo formado sólo por tres haplotipos y contenía mayoritariamente los aislados de plantas jóvenes con síntomas de la enfermedad de Petri. Mientras el segundo (grupo 2) agrupaba hasta 14 haplotipos diferentes, mostrando una gran variabilidad en los aislados procedentes de plantas adultas con síntomas de yesca y eutipiosis. Los resultados de este trabajo sugieren que ciertos genotipos podrían infectar más fácilmente las plantas jóvenes, mientras otros genotipos mostrarían una mayor afinidad por las plantas adultas. La ocurrencia de procesos de reproducción sexual en el interior de una planta puede explicar la existencia de una mayor diversidad genética en plantas adultas.

La caracterización molecular mediante marcadores moleculares de tipo RAPD y AFLP reveló la existencia de una importante variación genética en *Pm. aleophilum* (80% marcadores polimórficos). Con ambas técnicas se obtuvieron mayores grados de diversidad genética (Tabla 3.4.2) que los encontrados en el análisis de múltiples secuencias. Y lo mismo sucedió con el índice de Shannon normalizado (Tabla 3.4.2).

El análisis intra-específico de los marcadores RAPDs de 36 monospóricos de *Pm. aleophilum* permitió identificar un total de 27 haplotipos diferentes. La diversidad genética fue menor que la encontrada para una población de 15 aislados italianos (Tegli *et al.*, 2000), pero fue mayor que la reportada por Borie *et al.*, (2002) para una población de 107 aislados franceses (Tabla 3.4.1). Ambos trabajos utilizaron la técnica RAPD para caracterizar una población de *Pm. aleophilum*.

El tamaño de la población (N = 36) utilizado en este trabajo ha sido intermedio comparado con los trabajos de Tegli *et al.*, (2000) y Borie *et al.* (2002). Pero los resultados obtenidos representan el máximo número de marcadores polimórficos (76) nunca utilizados para caracterizar una población

de aislados de *Pm. aleophilum* (Tabla 3.4.1). Para comparar la variabilidad intra-específica de una población de aislados de *Pm. aleophilum* españoles con la variabilidad detectada en otros trabajos, se debe tener en cuenta el tamaño de la población analizada. Por ello, el índice de Shannon fue normalizado siguiendo lo propuesto por Borie *et al.*, (2002), que considera el tamaño de la población estudiada. Con esta corrección la diversidad de *Pm. aleophilum* en España fue mayor que en Francia y menor que en Italia (Tabla 3.4.1).

Tabla 3.4.1. Comparación de los resultados obtenidos al evaluar la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante RAPD en Italia, Francia y España. N: número de aislados analizados. **Np:** número de marcadores polimórficos. **G:** número de haplotipos. **G/N:** diversidad genética. **H:** índice de Shannon normalizado.

	N	Iniciadores	Np	G	G/N	H
Italia (Tegli <i>et al.</i>, 2000)	15	4	51	15	1,00	1,00
Francia (Borie <i>et al.</i>, 2002)	107	5	6	18	0,17	0,37-0,58
España (este trabajo)	36	12	76	27	0,75	0,90

La mayoría de los aislados de *Pm. aleophilum* incluidos en el análisis RAPD procedían de Castilla y León. En 2008, Cobos & Martín utilizaron la técnica RAPD y la secuenciación parcial de la región ITS y los genes de la β -tubulina (exones 2 a 6) y FE1- α para caracterizar una población de aislados de *Pa. chlamydospora* procedentes de Castilla y León. La variación genética de *Pa. chlamydospora* publicada por Cobos & Martín (2008) fue menor que la encontrada en este trabajo para *Pm. aleophilum*. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Tegli *et al.*, (2000), quienes afirmaron que la variabilidad genética era mayor en *Pm. aleophilum* que en *Pa. chlamydospora*.

Tres haplotipos diferentes de *Pm. aleophilum* fueron encontrados en la planta Y085. Resultados que demuestran la existencia de diversidad genética dentro de una misma cepa han sido previamente citados para la especie *Phaeomoniella chlamydospora* (Pottinger *et al.*, 2002; Mostert *et al.*, 2006b; Cobos & Martín, 2008). En el caso de *Pa. chlamydospora*, cuyo teleomorfo no se conoce, este fenómeno ha sido explicado mediante el suceso de infecciones múltiples de una misma planta (Mostert *et al.*, 2006b; Cobos & Martín, 2008).

La forma sexual de *Pm. aleophilum* es conocida (*T. minima*) (Mostert *et al.*, 2003) y ha sido encontrada en la naturaleza (Rooney-Latham *et al.*, 2005). Por lo tanto, la diversidad intra-específica de *Pm. aleophilum* en una misma planta puede deberse tanto a fenómenos de recombinación genética, como a la concurrencia de múltiples infecciones.

Utilizando la técnica AFLP se encontraron un total de 17 haplotipos diferentes, uno para cada cultivo monospórico estudiado. Algunos monospóricos procedentes de un aislado y que compartieron el mismo patrón de marcadores RAPDs (ej. Jerez_a y Jerez_c), presentaron diferentes haplotipos con AFLP. Este es el primer trabajo en el que se ha aplicado la técnica AFLP para investigar la caracterización molecular de *Pm. aleophilum*. Los resultados obtenidos confirman que los marcadores de tipo AFLP proporcionan un mayor número de marcadores polimórficos y haplotipos diferentes que los RAPD (Tabla 3.4.2). Ventajas similares han sido encontradas por otros autores que utilizaron la técnica AFLP para el estudio de poblaciones de *Pa. chlamydospora* (Pottinger *et al.*, 2002; Comont *et al.*, 2010).

De forma general, cuanto mayor es el número de marcadores evaluados, mayor es el número de haplotipos diferenciados. Los valores del índice de Shannon normalizado y la diversidad genética obtenidos en este trabajo ratifican esta afirmación. Así los marcadores AFLP mostraron valores máximos de diversidad estimados a partir de 308 marcadores polimórficos, mientras la caracterización molecular mediante el análisis de secuencias proporcionó los valores más bajos de diversidad, estimados a partir de 29 marcadores (Tabla 3.4.2). Los valores de correlación (R), obtenidos al comparar las matrices de distancia genética mediante el test de Mantel, sirvieron para comparar las tres técnicas moleculares utilizadas en la caracterización de *Pm. aleophilum*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.4.2. Los menores valores de correlación fueron encontrados al comparar las matrices de distancia calculadas con los marcadores RAPDs y las secuencias de ADN (~ 0,4). Las matrices construidas con los marcadores de tipo AFLP mostraron un ajuste similar tanto con la técnica RAPD como con el análisis de secuencias (~ 0,6), demostrando la robustez de los datos derivados del análisis AFLP.

Tabla 3.4.2. Comparación de los resultados obtenidos al evaluar la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante el análisis de secuencias y marcadores moleculares RAPD y AFLP. N: número de monospóricos analizados. Np: número de marcadores polimórficos. G: número de haplotipos. G/N: diversidad genética. H': índice de Shannon. H: índice de Shannon normalizado. **Correlación R:** Valores de ajuste R, obtenidos al comparar las matrices de distancia con el test de Mantel. ^a: cálculo realizado con las matrices basadas en el índice de Jaccard. ^b: cálculo realizado con las matrices basadas en la proporción de bandas comunes.

	N	Np	G	G/N	H'	H	Correlación R		
							Secuencias	RAPD	AFLP
Secuencias	30	29	17	0,57	2,72	0,80	0,994	0,36 ^b	0,65 ^b
RAPD	36	76	27	0,75	3,24	0,90	0,39 ^a	0,988	0,59 ^b
AFLP	17	308	17	1,00	2,83	1,00	0,66 ^a	0,63 ^a	0,996

Los análisis de caracterización genética empleando marcadores moleculares demostraron la existencia de tres grupos en la población de *Pm. aleophilum* estudiada. Los grupos genotípicos encontrados no estuvieron relacionados con el origen geográfico de las muestras de *Vitis vinífera*, excepto para los aislados de plantas procedentes de Extremadura. Resultados similares han sido publicados por otros autores en Italia (Tegli *et al.*, 2000) y Francia (Borie *et al.*, 2002). La correlación entre determinados haplotipos y el origen geográfico resulta interesante para relacionar las fuentes de inóculo con un posible movimiento del material vegetal infectado.

Recientemente, Comont *et al.*, (2010) introdujeron la aplicación del programa Structure v2.2 y el análisis multivariante PCA para investigar la estructura genética de una población de *Pa. chlamydospora* caracterizada mediante marcadores de tipo AFLP en Francia. Los mismos autores resaltaron la relevancia de clasificar los aislados que conforman una población de acuerdo con su combinación genética, más que con el origen geográfico de las vides infectadas.

Siguiendo los análisis de agrupamiento propuestos por Comont *et al.*, (2010), en combinación con la construcción de dendogramas basados en distancias genéticas, se han establecido tres grupos consistentes en los que puede ser subdividida la población de *Pm. aleophilum* analizada en este trabajo.

Los monospóricos aislados a partir de plantas jóvenes con síntomas de la enfermedad de Petri y los aislados CBS631.94 e INIA apenas se distanciaron genéticamente y siempre se agruparon juntos (grupos R-I, A-I). Además este grupo también fue observado en la caracterización intra-específica de *Pm. aleophilum* mediante el análisis de secuencias (grupo 1) y fue distinguido morfológicamente por una menor tasa de crecimiento, una coloración beige o marrón claro del micelio aéreo y la ausencia de pigmentación amarilla en PDA.

Los monospóricos de aislados procedentes de plantas con síntomas de yesca presentaron una elevada semejanza genética y tendieron a agruparse conjuntamente (grupos R-II/R-III y A-II). Pero los grupos homólogos establecidos en base a la secuenciación de seis regiones genómicas (S-II y S-III) no fueron consistentes. Este grupo tampoco fue delimitado en base a la caracterización fenotípica, aunque se apreció una diferencia significativa en el color del reverso de la placa para los aislados del grupo S-III.

Finalmente, la mayoría de los monospóricos obtenidos de plantas con síntomas de eutipiosis conformaron un grupo robusto y consistente, de acuerdo con la caracterización molecular basada en marcadores de tipo RAPD y AFLP (R-IV y A-III). Los nucleótidos variables encontrados en la secuenciación parcial de los genes de la actina, y FE1- α permitieron establecer cinco haplotipos que conformaron el grupo homólogo (S-IV). Sin embargo, este grupo no fue consistente. Fenotípicamente los aislados de este grupo se caracterizaron por presentar siempre pigmentación amarilla en PDA y una coloración gris-ocre (caracteres también observados en aislados del grupo S-II).

En conjunto los resultados obtenidos sugieren que el perfil genético de *Pm. aleophilum* podría influir en los síntomas de decaimiento expresados por una planta enferma. Sin embargo, esta hipótesis debe ser valorada con precaución, ya que se observaron genotipos intermedios (ej. Y085-15-2z, Figura 3.3.5 A) y aislados que correspondieron a uno u otro grupo dependiendo del tipo de análisis realizado (ej. Y082-02-5, Figuras 3.3.6 y 3.3.7; Y182-01-1 Figuras 3.3.5 A y 3.3.19).

Los marcadores moleculares también pueden ofrecer información sobre otras características relevantes en el estudio de los decaimientos de la vid,

como la agresividad o patogenicidad de los hongos asociados. En el caso de la especie *Eutypa lata* se ha probado una asociación entre la diversidad genética y la agresividad (Péros & Berger, 2003). Pero Laveau *et al.*, (2009) no encontraron diferencias significativas en la agresividad de distintos aislados de *Pm. aleophilum*. Para comprender mejor la relación de los tres grupos genotípicos encontrados en este estudio con la agresividad, será necesario realizar ensayos de patogenicidad con los aislados de *Pm. aleophilum* caracterizados genotípicamente.

Otros factores como la comunidad de aislados fúngicos que conviven en una planta (ver Tablas 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4), los procesos de recombinación que una especie sufre en el interior de la vid o los factores abióticos, también pueden tener una influencia decisiva en la expresión de los síntomas observados en las plantas afectadas.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 91: 1187-1193.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. & García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): 325-329.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2007). First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevines in Spain. *Plant Pathology*: 57, 386.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 165-174.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Sykes, B.C. & Richards, M.B. (1995). Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*, 141: 743-753.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Borie, B., Jacquiot, L., Jamaux-Despréaux, I., Larignon, P. & Péros, J.P. (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology*, 51: 85-96.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Carter, M.V. (1976). Biennial Report of the Waite Agricultural research Institute, South Australia, for 1974-1975, pp. 96-97.
- Cobos, R. (2008). Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

- Cobos, R. & Martín, M.T. (2008). Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines of Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.
- Comont, G., Corio-Costet, M.F., Larignon, P. & Delmotte, F. (2010). AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 451-464.
- Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J. & Van Wyk, P.S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88: 786-796.
- Damm, U., Mostert, L., Crous, P.W. & Fourie, P.H. (2008). Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia*, 20: 87-102.
- Di Marco, S., Calzarano, F., Osti, F. & Mazzullo, A. (2004). Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology*, 33: 337-342.
- Dupont, J., Laloui, W. & Magnin, S. (2000). *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. *Mycologia*, 92: 499-504.
- Dupont, J., Magnin, S., Césari, C. & Gatica, M. (2002). ITS and β -tubulin markers help delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *P. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research*, 106: 1143-1150.
- Edwards, J. & Pascoe, S. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australia grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 33: 273-279.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P.W., Gronewald, J. Z. & Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*, 21: 119-134.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Fischer, M. & Kassemeyer, H.H. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, 42: 109-116.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2006). Occurrence of Fungal Pathogens Associated with Grapevine Nurseries and Decline of Young Vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154: 598-602.

- Glass, N.L. & Donaldson, G.C. (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330.
- Graham, A.B., Johnston, P.R. & Weir, B.S. (2009). Three new *Phaeoacremonium* species on grapevines in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 38: 505-513.
- Gramaje, D., Alainz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). First report of *Phaeoacremonium mortioniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*: 91, 1206.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2008). First report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 92: 836.
- Gramaje, D., Armengol, J., Colino, M.J., Santiago, R. Moralejo, E., Luque, J. & Mostert, L. (2009a). First report of *Phaeoacremonium inflatipes*, *P. iranianum*, and *P. sicilianum* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 93: 964
- Gramaje, D., Armengol, J., Mohammadi, H., Banihashemi, Z. & Mostert, L. (2009b). Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia*, 101: 920-929.
- Gramaje, D. & Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease*, doi:10.1094/PDIS-01-11-0025.
- Groenewald, M., Kang, J.C., Crous, P.W. & Gams, W., (2001). ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycological Research*, 105: 651-657.
- Guarro, J., Alves, S.H., Gené, J. Grazziotin, N.A., Mazzuco, R., Dalmagro, C. Capilla, J., Zaror, L. & Mayayo, E. (2003). Two cases of subcutaneous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1332-1336.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur distribution florale. *Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Lardner, R., Stummer, B.E., Sosnowski, M.R. & Scott, E.S. (2005). Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*, 109: 799-808.

- Larignon, P. & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 147-157.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 32-46.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Martin, M.T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.
- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. & Summerbell, R.C. (2003). *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Robert, V., Sutton, D.A., Padhye, A.A., & Crous P.W. (2005) Species of *Phaeoacremonium* associated with human infections and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1752-1767.
- Mostert, L., Gronewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W. & Crous P.W. (2006a). Taxonomy and Pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54: 1-115.
- Mostert, L., Abln, E.C.A., Halleen, F. & Crous, P.W. (2006b). Genetic diversity among isolates of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 35: 453-460.
- Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown woodstreaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83: 404-418.
- Muruamendiaraz, A. & Legorburu, F.J. (2009). Sutiability of an increment borer as a sampling device for grapevine trunk disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 145-149.
- Nei, M., & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269-5273.
- Nei, M. & Takezaki, N. (1994). Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis, pp. 405-412 in Proc. 5th World Congress Genet. Appli. Livestock Production, edited by C. Smith, University of Guelph, Canada, Vol.21.

- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. Oxford, New York.
- O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 7:103–116.
- Péros, J.P., Jamaux-Despréaux, I. & Berger, G. (2000). Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 150-155.
- Péros, J.P. & Berger, G. (2003). Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 909-919.
- Péros, J.P., Berger, G. & Jamaux-Despréaux, I. (2008). Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vineyards in Languedoc-Rousillon (France). *Journal of Phytopathology*, 156: 297-303.
- Petit, E. & Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89: 1051-1059.
- Pottinger, B., Stewart, A., Carpenter, M. & Ridgway, H.J. (2002). Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 199-211.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A. & Gubler, W.D. (2005) Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease*, 89: 177-184.
- Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V. & Tuset, J.J. (2008). Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 650-660.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana, IL, USA: University of Illinois Press.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony

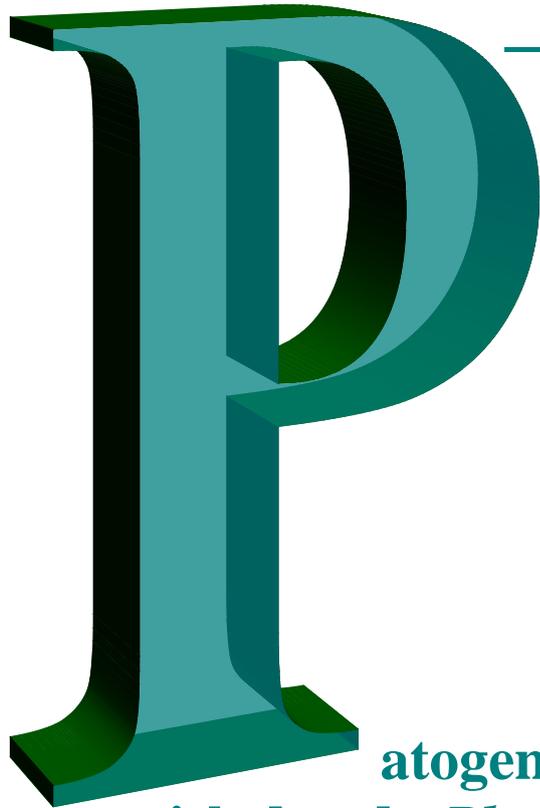
Methods. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msr121.

Tegli, S., Santilli, E., Bertelli, E. & Surico, G. (2000). Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 125-133.

Trouillas, F.P. & Gubler, W.D. (2004). Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen of grapevine in Northern California. *Mycological Research*, 108: 1195-1204.

Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* 10: 569-570.

White, T.J., Bruns, T., Innis, M.A., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp 315-322.



Patogenicidad y virulencia de aislados de *Phaeoacremonium aleophilum* resistentes a fungicidas

4.1. ANTECEDENTES

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

4.2.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

4.3.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

4.4.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

4.5. BIBLIOGRAFÍA

4.-PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Phaeoacremonium aleophilum* RESISTENTES A FUNGICIDAS

4.1. ANTECEDENTES

El conocimiento sobre la patogenicidad y virulencia de los hongos asociados a los decaimientos de la vid puede contribuir de forma decisiva a un manejo más eficiente de estas enfermedades. Un hongo se considera patógeno si es capaz de causar una enfermedad en un huésped susceptible, *Vitis vinifera*, en este caso. La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad y es un rasgo específico de cada aislado ligado a la selección natural para su evolución. La virulencia es difícil de evaluar, pero puede valorarse en función de la frecuencia de infección en una población dada, del número de microorganismos que se acumulan en el tejido infectado o de la intensidad de los síntomas observados en el huésped incluyendo los efectos letales.

El creciente número de especies del género *Phaeoacremonium* asociado con los decaimientos de la vid, ha motivado la realización de inoculaciones artificiales con varias especies del género (Halleen *et al.*, 2007; Aroca & Raposo, 2009; Gramaje *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2011). En general los estudios realizados han comparado la capacidad patogénica de *Pm. aleophilum* con *Pa. chlamydospora* (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007; Zanzotto *et al.*, 2008) y, en menor medida, con otros hongos asociados a los decaimientos de la vid (Laveau *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010). La mayoría de estos trabajos han sido realizados con uno o dos aislados de cada especie. Únicamente Laveau *et al.* (2009) utilizaron nueve aislados de *Pm. aleophilum*, pero no encontraron diferencias significativas en la agresividad de los distintos aislados. Hasta la fecha, la relación entre la diversidad genética, la patogenicidad y el grado virulencia de *Pm. aleophilum* no ha sido estudiada.

Diferentes tipos de material vegetal, como plántulas, esquejes enraizados (Aroca & Raposo 2009; Laveau *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010), plántulas de

Vitis vinífera in vitro (Zanzotto *et al.*, 2008) o plantas adultas en campo (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007) han sido utilizados para analizar la patogenicidad de *Pm. aleophilum*.

Los métodos de inoculación empleados también han sido variables. La técnica más utilizada ha sido la inserción de micelio o esporas en heridas y cortes (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007; Halleen *et al.*, 2007; Zanzotto *et al.*, 2008; Laveau *et al.*, 2009). Otras metodologías han empleado suspensiones de conidios, introducidas en el material de vid mediante una simple inmersión en agitación (Larignon & Dubos, 1997; Aroca & Raposo 2009), o por técnicas de vacío que provocan la inoculación homogénea de todo el sistema vascular (Aroca & Raposo, 2009; Gramaje *et al.*, 2010).

Phaeoacremonium aleophilum ha sido re-aislado con éxito en el material vegetal inoculado, pero uno de los mayores problemas que surgen al comprobar los postulados de Koch y estudiar la virulencia, es la evaluación de los síntomas provocados en vid. Según los resultados obtenidos por Aroca & Raposo, (2009), los síntomas más importantes para evaluar la patogenicidad de *Phaeoacremonium* spp. son las lesiones vasculares, la reducción del peso de la raíz y la necrosis inter-nervial de las hojas. Sin embargo, en varias investigaciones no se han detectado síntomas foliares en las plantas inoculadas con *Pm. aleophilum* (Laveau *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010). Sparapano *et al.* (2001) y Feliciano *et al.* (2004) demostraron que los síntomas foliares aparecen transcurridos dos o tres años después de la inoculación.

Aroca & Raposo, (2009) no detectaron diferencias significativas con el tratamiento control en algunos parámetros (fallo en la brotación de yemas, peso y longitud de los brotes). Pero otros autores han encontrado una correlación significativa entre las lesiones vasculares y la brotación o el peso de los sarmientos (Gramaje *et al.*, 2010). Así como un efecto significativo de *Pm. aleophilum* en la longitud de los brotes de plantas inoculadas (Eskalen *et al.*, 2007).

La necrosis vascular es el síntoma asociado con más frecuencia a la inoculación con *Pm. aleophilum*. Dos metodologías han sido utilizadas para cuantificar las lesiones vasculares: i) la medición de la longitud de la zona

necrosada, ii) la utilización de una escala de síntomas. Zanzotto *et al.* (2008) demostraron una elevada correlación entre los síntomas de lesiones vasculares valoradas mediante una escala objetiva de síntomas y el análisis informatizado de imágenes.

Entre las características agronómicas de las variedades de vid, la susceptibilidad o la resistencia a patógenos que reducen la producción, es de gran interés. En California, Feliciano *et al.*, (2004) encontraron que la variedad Thompson Seedless fue significativamente más susceptible a *Pm. aleophilum* que las variedades Garnacha y Cabernet Sauvignon. En Italia, Sparapano *et al.* (2001) han descrito que la variedad Italia es más susceptible que la variedad Matilde a *Pm. aleophilum*. En España se ha demostrado la susceptibilidad de las variedades Malvar, Airen y Monastrel (Aroca & Raposo, 2009), pero no se han hecho estudios comparativos con los cultivares más extendidos en Castilla y León, como Tempranillo y Verdejo.

La capacidad de *Pm. aleophilum* para penetrar en vid a través de las heridas de poda ha sido demostrada en varios trabajos de patogenicidad (Sparapano *et al.*, 2001; Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007). Por ello, la protección de éstas heridas con fungicidas es una medida útil para prevenir la propagación de los decaimientos de la vid.

En 2006, Márquez publicó los resultados de un producto comercial, Escudo[®] (SE, Du Pont, Barcelona, España), utilizado como fungicida preventivo para el control eficaz de las enfermedades de madera de vid, especialmente contra *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Se trata de una suspo-emulsión compuesta por dos fungicidas sistémicos (10/5 g l⁻¹): flusilazol (un silico-triazol con efecto inhibidor de la dimetilación o esterol-DMI) y carbendazima (un bencimidazol). De aspecto viscoso y coloración azul turquesa, su fórmula asegura una penetración rápida y profunda de ambas materias activas en la madera. Aplicado sobre las heridas de poda con periodicidad anual desde el inicio de la plantación, Escudo[®] evita que los patógenos contaminen la madera y confiere una actividad curativa en las primeras fases del proceso infectivo (Márquez, 2006). La efectividad de la carbendazima en la inhibición tanto del micelio como de la germinación de

esporas de *Pm. aleophilum* ha sido demostrada por otros autores (Gramaje *et al.*, 2009).

Debido a la reciente preocupación por la infección y propagación de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en los procesos de producción viverística, se están investigando diferentes medidas de control de tipo físico (termoterapia), químico (materias activas y fungicidas) o biológico (*Trichoderma*).

Gramaje *et al.* (2009) estudiaron tres estrategias de control diferentes empleando carbendazima, carbendazima + flusilazol (Escudo[®]) y sulfato de hidroxiquilonina en distintos pasos de la producción de material vegetal de vid. La efectividad de las tres estrategias fue comparada en dos viveros comerciales independientes mediante el análisis de incidencia de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Ninguna de las dos especies fue aislada a partir del material vegetal producido utilizando la estrategia más eficiente. Dicha estrategia consistió en remojar el material en una suspensión de Escudo[®] antes del almacenado en cámara de frío, aplicar carbendazima durante el paso de hidratación y un nueva inmersión con Escudo[®] después del injertado.

La resistencia a fungicidas es una adaptación estable y heredable de un hongo a un fungicida, que reduce sustancialmente la sensibilidad del hongo al fungicida. Esta resistencia pueden ser resultado de una mutación simple o múltiple de genes (Ma & Michailides, 2005). La resistencia a las materias activas del grupo de los esterol-DMI y los bencimidazoles ha sido probada en numerosas especies fúngicas (Yarden & Katan, 1993, Schnabel & Jones, 2001; Baraldi *et al.*, 2003; Albertini *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003).

En los hongos, los DMIs inhiben la α -dimetilación del C-14 de un esterol (24-metilendihidrolanoesterol) precursor del ergosterol. Alteraciones en algunos aminoácidos y la sobre-expresión del gen CYP51 han sido asociadas con la resistencia a los esterol-DMIs (Hamamoto *et al.*, 2000). Albertini *et al.*, (2003) también han descrito la existencia de hongos resistentes de forma natural a los DMIs pertenecientes a la familia de los triazoles. Por lo que parece que existen varios mecanismos alternativos que confieren la resistencia de hongos fitopatógenos a los DMIs.

Por el contrario, la resistencia a los bencimidazoles ha sido mayoritariamente asociada con la localización de mutaciones puntuales en el gen de la β -tubulina, que resulta en una secuencia alterada de los aminoácidos traducidos en el sitio de unión de los bencimidazoles. Los bencimidazoles actúan bloqueando el ensamblaje de la β -tubulina durante la mitosis y no son eficientes si pierden la capacidad de adherirse a la proteína. Resultados de numerosos trabajos han descrito mutaciones en los codones 6, 50, 167, 198, 200, y 240 del gen de la β -tubulina que confieren resistencia a los bencimidazoles en varias especies fúngicas (Ma & Michailides, 2005), aunque algunas excepciones han sido citadas (Kawchuk et al., 2002).

Ante la complejidad que supone ofrecer al sector vitivinícola una eficiente respuesta para el control de las afecciones provocadas por *Pm aleophilum*, el presente Capítulo pretende esclarecer algunos aspectos relacionados con la patogenicidad y respuesta de *Pm. aleophilum* a la utilización de fungicidas. Para ello se abordan los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la patogenicidad y virulencia de aislados de *Pm. aleophilum* pertenecientes a distintos grupos genotípicos.
- 2) Comparar la susceptibilidad de las variedades de vid Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura a la infección por *Pm. aleophilum*.
- 3) Determinar la existencia de aislados de *Pm. aleophilum* resistentes a fungicidas en el campo español.
- 4) Buscar las alteraciones genéticas que confieren resistencia de *Pm. aleophilum* a determinados fungicidas.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

4.2.1.1. Aislados utilizados

El estudio del carácter patogénico de seis cultivos monospóricos se llevó a cabo mediante inoculaciones controladas siguiendo los postulados de Koch (Agrios, 1969). Los monospóricos utilizados pertenecieron a grupos genotípicos distintos, de acuerdo con los resultados del Capítulo 3. La variedad, el origen geográfico y la sintomatología de las plantas de las que fueron aislados también fue diferente (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1. Cultivos monospóricos utilizados para evaluar la patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum* en este trabajo. ²: Aislados procedentes de Castilla y León. TP: Tempranillo, VD: Verdejo

Origen	<i>Vitis vinifera</i>			Monospóricos	Grupo genotípico
	Variedad	Edad	Síntomas		
Valles de Benavente ²	nd	>20	nd	Y038-05-3a	R-IV, A-III, S-IV
Valles de Benavente ²	nd	>20	nd	Y038-05-3z	R-IV, A-III, S-IV
Extremadura	TP	1	Petri o pie negro	Y108-02-2a	R-I, A-I, S-I
Extremadura	TP	1	Petri o pie negro	Y108-02-2z	R-I, A-I, S-I
Rueda ²	VD	>100	yesca	Y235-04-1a	R-II, A-II, S-II
Rueda ²	VD	>100	yesca	Y235-04-1w	R-II, A-II, S-II

4.2.1.2. Inoculaciones

Para estudiar la patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum* se efectuaron dos experimentos distintos, uno utilizando sarmientos verdes y otro utilizando plantas injertadas sobre patrón Richter 110 y enraizadas, procedentes de viveros comerciales.

i. Sarmientos

Un total de 196 sarmientos verdes fueron utilizados para investigar la patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum* (Tabla 4.2.2). Todos los sarmientos fueron suministrados por el Departamento de Viticultura del ITACyL, tras realizar la poda. Procedían de vides sanas de las variedades Tempranillo, Verdejo y Garnacha de unos 20 años de edad. Los sarmientos fueron cortados en fragmentos de unos 15 cm de longitud y almacenados a 4 °C durante un mes. Posteriormente fueron desinfectados superficialmente con una suspensión al 1,5% de hipoclorito sódico durante 1 minuto y lavados con abundante agua destilada estéril. Por último fueron secados en una cabina de flujo laminar durante 15 minutos bajo luz ultravioleta. Antes de la inoculación se realizó un corte de 1 cm en uno de los extremos de cada sarmiento.

Siete sarmientos de cada una de las tres variedades estudiadas (Tempranillo, Verdejo y Garnacha) fueron inoculados en el extremo recortado con cada uno de los seis monospóricos analizados. Para preparar el inóculo se hicieron crecer los monospóricos de *Pm. aleophilum* previamente en medio PDA durante 3 semanas en oscuridad a 25 °C. Los inóculos consistieron en un cuadro, de unos 4 mm, del micelio marginal de cada monospórico en contacto con la madera (Figura 4.2.1). Siete sarmientos fueron inoculados con un cuadro de PDA estéril y utilizados como control. El experimento fue repetido dos veces con sarmientos de la variedad Tempranillo, para comparar los resultados obtenidos con los del apartado 4.2.2.2.



Figura 4.2.1. A: Método de inoculación en sarmientos verdes. B: Disposición de los sarmientos inoculados en tubos Falcon® y gradillas en la cámara bajo condiciones controladas.

Los sarmientos inoculados fueron depositados en tubo Falcon[®] y mantenidos en una cámara bajo condiciones controladas de temperatura (18-20 °C), humedad (50%) y con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, durante dos meses. La efectividad de las inoculaciones fue comprobada mediante el re-aislamiento de *Pm. aleophilum* a 1 cm por encima de la zona inoculada siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3). Seis astillas de cada sarmiento fueron depositadas en placas con medio PDA y cultivadas a 25 °C en oscuridad hasta que el tamaño de las colonias obtenidas fue suficiente para identificarlas. La identificación se realizó por métodos morfológicos o mediante PCR con los oligonucleótidos específicos PalN1 y Pal2 (ver Capítulo 1).

ii. Plantas injertadas

Las vides enraizadas de un año de edad fueron plantadas en macetas de tres litros utilizando como sustrato una mezcla de turba, tierra local y arena (1:1:1) previamente esterilizada. Las plantas se dispusieron en bandejas de cuatro macetas dispuestas al azar, y fueron mantenidas en un invernadero dotado de riego automatizado y de un sistema de refrigeración *cooling* durante un año para obtener madera lignificada de la variedad antes de proceder a su inoculación. Las variedades evaluadas fueron Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura.

Todas las plantas fueron podadas durante el mes de Febrero de 2010. Dos semanas después se efectuó la inoculación siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.7 (Capítulo 2), pero en este caso la incisión se realizó entre el segundo y tercer pulgar. La zona de la planta donde se realizó la herida fue previamente desinfectada en la superficie con etanol al 70%. El inóculo fue preparado en medio PDA tal y como se ha descrito para la inoculación de los sarmientos. Se realizaron siete réplicas (plantas de vid) por cada uno de los monospóricos y variedades de vid analizadas. Siguiendo el mismo procedimiento se inocularon siete plantas de vid de cada variedad (Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura) con fragmentos de PDA sin micelio fúngico, que fueron utilizadas como control. En total se utilizaron 196 plantas

injertadas (Tabla 4.2.2). Las plantas se mantuvieron en un invernadero a una temperatura de 20-25 °C y en condiciones óptimas de humedad.

Tabla 4.2.2. Número de sarmientos verdes y plantas utilizadas para investigar la patogenicidad y virulencia de seis monospóricos de *Pm. aleophilum*. TP: Tempranillo; VD: Verdejo; GR: Garnacha y VI: Viura.

Monospóricos	Sarmientos verdes			Plantas injertadas			
	Variedad de <i>Vitis vinifera</i>						
	TP	VD	GR	TP	VD	GR	VI
Y038-05-3a	14	7	7	7	7	7	7
Y038-05-3z	14	7	7	7	7	7	7
Y108-02-2a	14	7	7	7	7	7	7
Y108-02-2z	14	7	7	7	7	7	7
Y235-04-1a	14	7	7	7	7	7	7
Y235-04-1w	14	7	7	7	7	7	7
control	14	7	7	7	7	7	7
	Total = 196			Total = 196			

Cuatro meses después de la inoculación, se cortó el pulgar inoculado desde la base, incluyendo los pámpanos brotados, y se efectuaron aislamientos en dos zonas diferentes: a 1 cm por encima de la inoculación en la madera lignificada y en el nuevo pámpano para ver el avance del patógeno. El re-aislamiento e identificación de *Pm. aleophilum* se llevó a cabo en PDA siguiendo la metodología descrita anteriormente para los sarmientos.

4.2.1.3. Parámetros evaluados

Para determinar la patogenicidad y el grado de virulencia de *Pm. aleophilum* se calcularon el índice de severidad y el índice de McKinney.

El índice de severidad de cada monospóricico, estimado como el porcentaje medio de astillas a partir de las cuáles se re-aisló *Pm. aleophilum* (Gramaje *et al.*, 2009), fue sometido a un análisis de la varianza ANOVA con un único factor (cultivo monospóricico). Se comprobó la normalidad e independencia de los datos, que en ocasiones fueron transformados logarítmicamente para cumplir con los requisitos del análisis ANOVA. Los test de Cochran y de Bartlett fueron utilizados para comprobar la homocedasticidad (homogeneidad de varianzas). El test de Cochran detectaría una varianza grande frente al resto y el de Bartlett grupos de varianzas distintos. Este análisis fue realizado de forma independiente para cada una de las variedades

de vid estudiadas. El test LSD sirvió para determinar qué monospóricos fueron significativamente más patógenos con un $P < 0,01$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Pockville, MD, USA).

Tanto en los sarmientos como en las plantas inoculadas se analizó la intensidad de enfermedad generada por los distintos monospóricos de *Pm. aleophilum*. Para ello se evaluaron las lesiones vasculares siguiendo una escala de síntomas de 0 a 3; dónde 0 = madera sana, sin lesiones aparentes, 1 = necrosis suave o incipiente; 2 = necrosis moderada o severa; 3 = madera muerta. Para observar la presencia de síntomas vasculares las muestras de vid se limpiaron cuidadosamente con agua destilada estéril después de eliminar la corteza y los tejidos subyacentes.

El índice propuesto por McKinney (1923), fue calculado utilizando la fórmula: $I = [\Sigma (R \times N)] \times 100 / H \times T$, dónde R es el valor de las lesiones vasculares de acuerdo con la escala establecida; N es el número de plantas o sarmientos con el mismo valor de R; H es el número más elevado de la escala (en este caso 3) y T es el número total de plantas o sarmientos considerados. Este índice ha sido previamente utilizado por otros investigadores en estudios de inoculación de hongos asociados con la enfermedad de Petri y la yesca (Gramaje *et al.*, 2010).

Con el mismo programa estadístico, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para determinar si existía una relación entre el índice de severidad y el índice de McKinney con un nivel de confianza del 99%. Este análisis se realizó por separado con el conjunto de datos obtenidos a partir de la inoculación de sarmientos verdes y de plantas injertadas.

Las plantas inoculadas fueron observadas regularmente para determinar la evolución de la enfermedad. Se anotaron tres tipos de síntomas externos: la no brotación de las yemas situadas por encima de la inoculación, la aparición de síntomas en hojas y la muerte o seca de la planta. Transcurridos cuatro meses, y antes de llevar a cabo el re-aislamiento de *Pm. aleophilum* se registró el número de plantas que formaron un chancro en el punto de inoculación.

4.2.1.4. Sensibilidad de la variedad de *Vitis vinifera*

La patogenicidad y virulencia no dependen únicamente del patógeno sino también del huésped que puede ser más o menos susceptible. Por ello se compararon los resultados obtenidos en las diferentes variedades evaluadas. Siguiendo la metodología descrita anteriormente se realizó un análisis comparativo entre las variedades analizadas mediante un análisis de la varianza ANOVA con un único factor (variedad de vid). Este análisis fue realizado de forma independiente para cada una de los seis monospóricos estudiados utilizando el índice de severidad. El test LSD sirvió para determinar qué variedades fueron significativamente más sensibles a cada monospórico de *Pm. aleophilum* con un $P < 0,01$.

4.2.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

4.2.2.1. Ensayo *in vitro*

i. Aislados utilizados

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron un total de 67 aislados fúngicos de *Pm. aleophilum*. La mayoría de ellos (63) fueron obtenidos de plantas de vid con síntomas de decaimiento o asintomáticas cultivadas en Castilla y León. Los aislados de referencia CBS631.94, CLM51.6, INIA y Jerez procedentes del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda), Valencia, Madrid y Jerez de la Frontera, respectivamente, también fueron incluidos en este ensayo (Tabla 4.2.3).

Tabla 4.2.3. Aislados de *Pm. aleophilum* utilizados en el ensayo *in vitro* de resistencia al fungicida Escudo®. ¹: Aislado CBS631.94 procedente de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. ³: Aislado cedido por la Dra. R. Raposo, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA, Madrid). ⁴: Aislado cedido por el Dr. P. García Benavides, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Aldearrubia (Salamanca). ⁵: Aislado cedido por el Dr. J. García Jiménez, Universidad Politécnica de Valencia (Valencia). ⁶: Aislado cedido por D. J. Parra del servicio de Sanidad Vegetal de Jerez de la Frontera (Cádiz).

Aislados de <i>Pm. aleophilum</i>	Origen	Síntomas
CBS631.94 ¹	Italia	nd
CLM 51.6 ⁵	Valencia	nd
Jerez ⁶	Jerez de la Frontera	nd
INIA ³	Madrid	nd
S001-04-2 ⁴	Salamanca ²	yesca
S004-03-1 ⁴	Salamanca ²	Petri o pie negro
S016-03-1 ⁴	Salamanca ²	yesca
Y038-05-3	Valles de Benavente ²	nd
Y069-06-1	Ribera del Duero ²	nd
Y080-02-1	Toro ²	eutipiosis
Y082-02-5	Toro ²	eutipiosis
Y085-09-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y085-12-4	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y085-15-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y085-15-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y086-15-1	Toro ²	eutipiosis
Y089-04-6	Rueda ²	Petri o pie negro
Y104-06-1	Extremadura	Petri o pie negro
Y106-04-1	Extremadura	Petri o pie negro
Y107-06-1	Extremadura	Petri o pie negro
Y108-02-2	Extremadura	Petri o pie negro
Y110-07-1	Extremadura	Petri o pie negro
Y112-21-2	Arribes ²	eutipiosis
Y113-02-2	Arribes ²	eutipiosis
Y113-14-1	Arribes ²	eutipiosis
Y160-48-2	La Mancha	sin síntomas
Y161-17-1	Alicante	yesca
Y161-19-2	Alicante	yesca
Y162-06-4	Alicante	otros
Y168-14-2	Alicante	yesca
Y180-04-1	La Rioja	Black Dead Arm
Y182-01-1	Tierra del Vino de Zamora ²	yesca y eutipiosis

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 4.2.3. (Continúa de la página anterior)

Aislados de <i>Pm. aleophilum</i>	Origen	Síntomas
Y182-01-2	Tierra del Vino de Zamora ²	yesca y eutipiosis
Y182-03-1	Tierra del Vino de Zamora ²	yesca y eutipiosis
Y182-03-2	Tierra del Vino de Zamora ²	yesca y eutipiosis
Y182-09-1	Tierra del Vino de Zamora ²	yesca y eutipiosis
Y201-09-1	Toro ²	yesca
Y201-16-1	Toro ²	yesca
Y201-17-2	Toro ²	yesca
Y205-18-3	Cigales ²	yesca
Y213-12-4	Córdoba	Black Dead Arm
Y213-16-5	Córdoba	Black Dead Arm
Y214-09-3	Córdoba	sin síntomas
Y214-19-1	Córdoba	sin síntomas
Y220-03-3	Córdoba	Black Dead Arm
Y225-01-6	Rueda ²	eutipiosis
Y229-06-7	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y229-10-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y230-04-6	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y230-05-3	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y231-01-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y231-03-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y231-04-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y231-06-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y231-08-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y232-01-5	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y232-03-3	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y232-04-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y233-04-5	Rueda ²	yesca
Y233-05-4	Rueda ²	yesca
Y234-03-4	Rueda ²	Black Dead Arm
Y235-04-1	Rueda ²	yesca
Y236-04-6	Rueda ²	yesca
Y236-13-1	Rueda ²	yesca
Y251-03-2	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y251-07-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis
Y251-09-1	Ribera del Duero ²	eutipiosis

ii. Fungicidas

El fungicida Escudo[®] (SE, Du Pont, Barcelona, España) es una suspoemulsión que contiene dos materias activas: (i) Carbendazima (1%), que pertenece al grupo químico de los benzimidazoles y actúa bloqueando el ensamblaje de la β -tubulina durante la mitosis. (ii) Flusilazol (0,5%), que es un esteroide DMI-triazol cuya acción se atribuye a la interferencia en la síntesis de lípidos y membranas celulares.

El experimento se realizó en medio de cultivo PDA. Se extendieron de forma homogénea 150 μ l de Escudo[®] directamente sobre el medio solidificado con ayuda de un asa de Drigalsky. Las placas control fueron preparadas de forma similar sin adición de fungicida. En cada placa se depositó un cuadrado de agar de 4 mm procedente del margen exterior de un cultivo fresco de *Pm. aleophilum*. Se realizaron 15 réplicas por cada uno de los aislados estudiados. Las placas se incubaron durante 45 días en oscuridad a 25 °C.

Se realizaron otros dos ensayos para probar la eficiencia de las dos materias activas que contiene Escudo[®] por separado. Carbendazima al 1%, fue preparado a partir del formulado 50% (PW) Eurozum, Probelte S.A., (Murcia, Spain). Flusilazol al 0,5% se obtuvo a partir de una solución líquida concentrada del 40% (EC), comercializada como Nustar 40 EC, Du Pont Iberia, S.L. (España). Para realizar las diluciones necesarias se empleó glicerol al 50% previamente esterilizado. Los ensayos con carbendazima (1%) y flusilazol (0,5%) fueron realizados siguiendo la misma metodología empleada para Escudo[®]. En este caso se ensayaron cultivos monospóricos obtenidos a partir de los aislados resistentes a Escudo[®] (ver Tablas 4.3.4 y 4.3.5).

*4.2.2.2. Ensayo en sarmientos**i. Aislados utilizados*

Para realizar los ensayos de resistencia en sarmientos se emplearon los seis monospóricos previamente descritos en la Tabla 4.2.1.

ii. Inoculaciones

Para comprobar la resistencia de los aislados a Escudo[®] se realizó un ensayo que consistió en la protección de sarmientos de variedad Tempranillo con aplicación directa del fungicida sobre uno de los extremos. En total 49 sarmientos fueron impregnados con Escudo[®] tras la desinfección y el corte descritos en el apartado 4.2.1.2. Se dejaron secar durante una noche boca abajo para garantizar la absorción completa del fungicida (Figura 4.2.3 A).

Al día siguiente los sarmientos fueron inoculados siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.1.2 (Figura 4.2.3 B) y mantenidos durante dos meses en las mismas condiciones citadas anteriormente. Se realizaron siete réplicas (sarmientos) por cada uno de los seis monospóricos analizados. Siete sarmientos fueron inoculados con PDA estéril y utilizados como control. El experimento fue repetido dos veces.

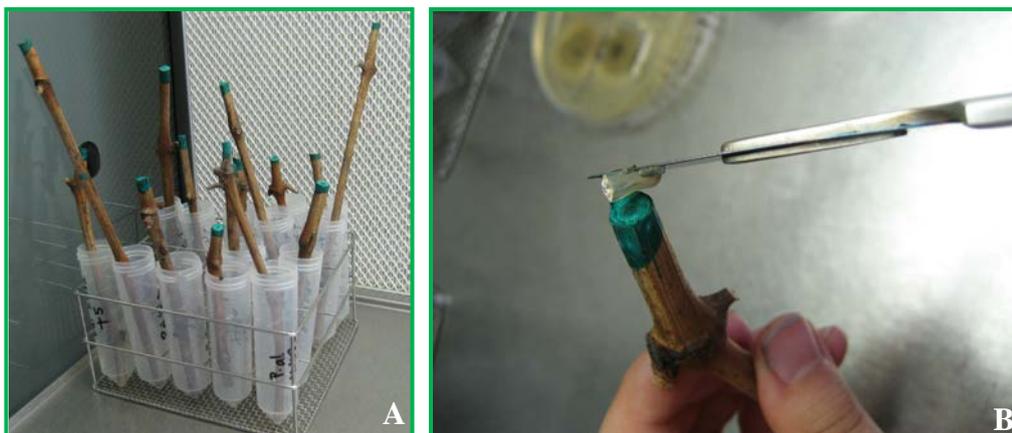


Figura 4.2.3. A: Sarmientos verdes impregnados con Escudo[®]. B: Inoculación de sarmientos verdes impregnados con Escudo[®].

Transcurridos dos meses, los sarmientos fueron analizados y el índice de severidad estimado de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.2.1.3. Los resultados obtenidos fueron comparados con la inoculación de sarmientos de la variedad Tempranillo sin fungicida mediante un análisis de la varianza ANOVA bifactorial (factor monospórico y factor fungicida) y el test $LSD_{0,01}$ fue utilizado para determinar las diferencias significativas. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Pockville, MD, USA).

4.2.2.3. Análisis genético

Se llevó a cabo un análisis de caracterización genética en el que se utilizaron seis aislados. Los aislados fueron seleccionados en función de la resistencia a Escudo[®] y los grupos genotípicos encontrados en el Capítulo 3. De cada aislado se analizaron dos cultivos monospóricos, uno sensible al fungicida Escudo[®] y otro resistente. En total se analizaron 12 cultivos monospóricos: CBS631.94a, Pal15b, Y038-05-3a, Y038-03-3z, Y082-02-5a, Y082-02-5z, Y108-02-2a, Y108-02-2z, Y161-19-2a, Y161-19-2z, Y235-04-1a e Y235-04-1w. El ADN de cada monospórico fue extraído y purificado según lo descrito en el apartado 2.2.1.2 (Capítulo 2) y utilizado para ampliar la caracterización molecular mediante marcadores AFLP y la secuenciación del gen de la β -tubulina.

i. AFLP

La metodología seguida para obtener marcadores moleculares de tipo AFLP ha sido descrita previamente en el apartado 2.2.1.3 de material y métodos del Capítulo 2. Para llevar a cabo la caracterización de los 12 monospóricos de *Pm. aleophilum* se utilizaron en este caso 64 combinaciones de iniciadores y solamente se analizaron los marcadores polimórficos de tamaño comprendido entre 37 y 481 pb. La reproducibilidad de los fragmentos amplificados fue comprobada dos veces, realizando todas las reacciones por duplicado a partir de dos extracciones independientes de ADN por monospórico.

Los marcadores polimórficos y reproducibles se transformaron en datos binarios (1 = presencia, 0 = ausencia). Con el conjunto de datos generado de los 12 monospóricos se calcularon los valores de semejanza genética según la ecuación matemática propuesta por Nei & Li (1979), basada en la proporción de bandas de ADN compartidas. El coeficiente de similitud (S) para cada par de monospóricos se calculó utilizando la Fórmula 3.2.1 (ver Capítulo 3, apartado 3.2.2.4, *Análisis inter-específico*). El programa “TREECON for Windows” (versión 1.3b) (Van de Peer & De Wachter, 1994), se empleó para

crear un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean) con 1000 remuestreos.

ii. β -tubulina

Dos regiones parciales del gen de la β -tubulina (exones 2 a 6 y exones 6 a 7) han sido previamente analizadas en el Capítulo 3 (Figura 4.2.4). A pesar de la variabilidad detectada, no se encontró ninguna relación entre la condición de resistencia o sensibilidad a Escudo[®] y las diferencias nucleotídicas observadas.

Dos nuevos oligonucleótidos iniciadores denominados L2 (5'-GCT TCT GGC AAC AAG TAT GTT-3') y R1 (5'-GGT GAC AGC ACG GAA AGA GT-3'), fueron diseñados con la herramienta disponible en el NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi> y sintetizados por Metabion International AG (Martinsried, Germany). El nuevo par de oligonucleótidos L2 y R1 permitió amplificar un fragmento de unos 650 pb y obtener la secuencia completa del exón 6 que codifica para la β -tubulina (Figura 4.2.4).

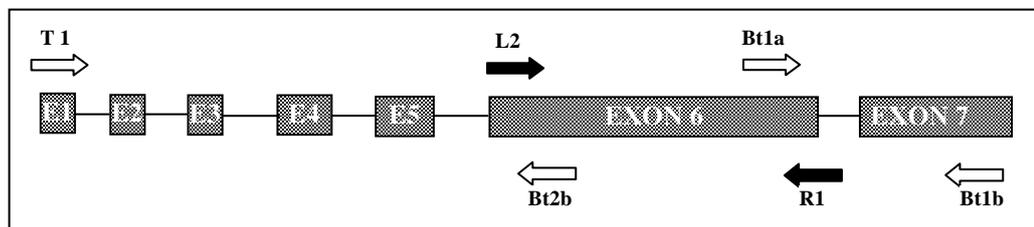


Figura 4.2.4. Representación esquemática de la región parcial del gen de la β -tubulina y localización de todos los pares de oligonucleótidos utilizados en la caracterización de *Phaeoacremonium*. Las flechas blancas representan los oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 3. Las flechas negras indican los nuevos oligonucleótidos diseñados para amplificar el exón 6 en *Pm. aleophilum*.

La mezcla de reacción se preparó utilizando 1× REDExtract-N-Amp tampón de PCR (XNAP Kit) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 0,6 μ M de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 1 μ L de ADN fúngico extraído con el mismo kit. La mezcla se ajustó con agua MiliQ hasta un volumen final de 40 μ l. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C, con un paso de extensión final de 7

minutos a 72 °C. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1x, cargando una alícuota de 5 µl de cada producto de PCR y fueron visualizados según lo descrito en el apartado 1.2.5.3 del Capítulo 1. Posteriormente fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones siguiendo la metodología de los apartados 1.2.5.4 y 1.2.5.5 (Capítulo 1). Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con la secuencia de un aislado de *Botryotinia fuckeliana* resistente al benomilo (GenBank: U27198).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

4.3.1.1. Sarmientos

La patogenicidad y el grado de virulencia de seis cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* fue evaluada mediante la inoculación de sarmientos verdes de las variedades Tempranillo, Verdejo y Garnacha. Transcurridos dos meses se calcularon el índice de severidad, basado en el re-aislamiento del patógeno, y el índice de McKinney, basado en la intensidad de las lesiones vasculares.

Todos los monospóricos estudiados fueron capaces de infectar la madera de *Vitis vinifera*. En conjunto *Pm. aleophilum* fue re-aislado a partir del 85% de los sarmientos inoculados con esta especie. No se re-aisló ningún *Pm. aleophilum* en los sarmientos inoculados con PDA y utilizados como control. Aunque sí se re-aislaron otros hongos considerados como saprófitos. En ningún caso se detectó la presencia de otros hongos asociados a los decaimientos de la vid.

Los resultados del análisis ANOVA mostraron un efecto significativo ($P < 0,01$) del cultivo monospórico sobre el índice de severidad en las tres variedades estudiadas. La Tabla 4.3.1 refleja los valores obtenidos para cada monospórico y los resultados del test LSD.

Tabla 4.3.1. Índice de severidad \pm error estándar, obtenido en el análisis de sarmientos verdes inoculados con *Pm. aleophilum*. Las letras iguales de cada columna indican medias que no difieren significativamente ($P < 0,01$) de acuerdo con el test LSD.

Monospórico	Variedad de <i>Vitis vinifera</i>		
	Tempranillo	Verdejo	Garnacha
Y038-05-3a	85,6 \pm 9,7c	88,2 \pm 7,9c	66,7 \pm 14,1b
Y038-05-3z	81,0 \pm 8,9bc	83,3 \pm 14,1c	81,0 \pm 10,6b
Y108-02-2a	86,8 \pm 7,4c	50,0 \pm 14,5bc	69,0 \pm 18,0b
Y108-02-2z	53,5 \pm 8,2b	61,8 \pm 13,0bc	59,5 \pm 17,0b
Y235-04-1a	83,3 \pm 8,4bc	57,2 \pm 13,5bc	57,2 \pm 15,4b
Y235-04-1w	69,0 \pm 11,9bc	33,3 \pm 15,0ab	33,3 \pm 14,1ab
Control (PDA)	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a

En la variedad Tempranillo, todos los monospóricos mostraron un índice de severidad significativamente superior al tratamiento control. Los monospóricos Y038-05-3a e Y108-02-2a mostraron un índice de severidad significativamente superior (85,6 y 86,8, respectivamente) que el monospórico Y108-02-2z (índice de severidad = 53,5). Los monospóricos Y038-05-3z, Y235-04-1a e Y235-04-1w mostraron índices de severidad intermedios.

En la variedad Verdejo, se encontró un índice de severidad significativamente mayor para los monospóricos Y038-05-3a e Y038-05-3z (88,2 y 83,3, respectivamente) que para el monospórico Y235-04-1w, que no fue significativamente diferente del tratamiento control (33,3). Para los monospóricos Y108-02-2a, Y108-02-2z e Y235-04-1a se obtuvieron índices de severidad intermedios.

En la variedad Garnacha, el monospórico Y235-04-1w tampoco fue significativamente diferente al control (índice de severidad = 33,3). Los demás monospóricos mostraron un índice de severidad significativamente superior al tratamiento control, pero no existieron diferencias significativas entre ellos. La patogenicidad más alta en la variedad Garnacha correspondió al monospórico Y038-05-3z (índice de severidad = 81,0).

Para comparar la sensibilidad de las variedades de *Vitis vinifera* incluidas en el experimento, los resultados de la Tabla 4.3.1 fueron representados gráficamente (Figura 4.3.1). El análisis ANOVA realizado con el factor variedad de vid no fue significativo ($P > 0,05$) para ninguno de los seis monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados.

Aunque no existió un efecto significativo de la variedad de vid sobre el índice de severidad, en la Figura 4.3.1 se puede observar como los mayores índices de severidad se encontraron en la variedad Tempranillo. Las diferencias observadas fueron notables para los monospóricos Y108-02-2a, Y235-04-1a, e Y235-04-1w.

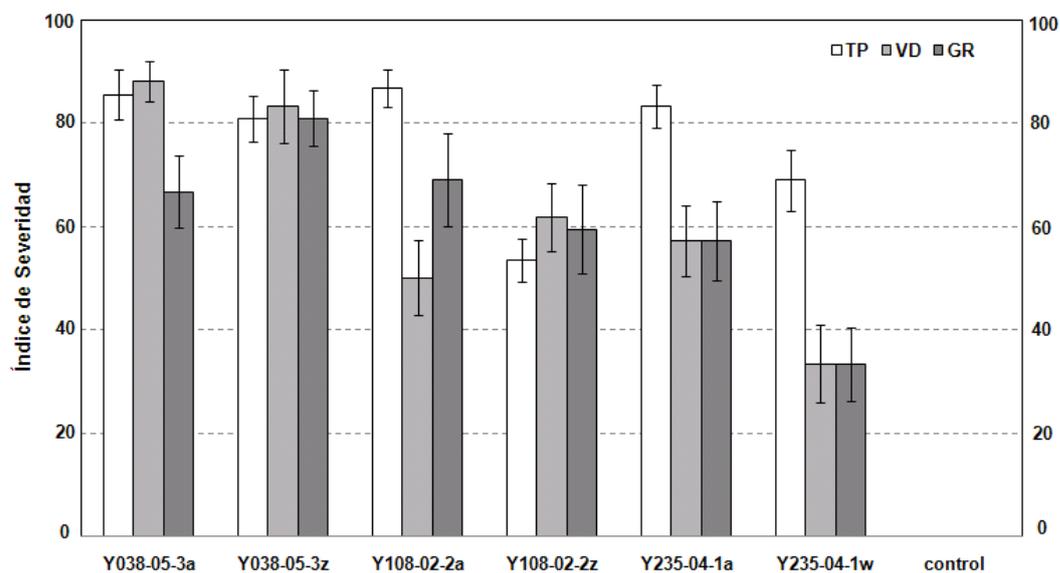


Figura 4.3.1. Gráfico construido con los valores del índice de severidad obtenidos en el análisis de sarmientos verdes inoculados con *Pm. aleophilum*. Las barras indican el error estándar. TP: Tempranillo; VD: Verdejo y GR: Garnacha.

La Figura 4.3.2 muestra los síntomas observados en los sarmientos inoculados y la escala utilizada para calcular el índice de McKinney.

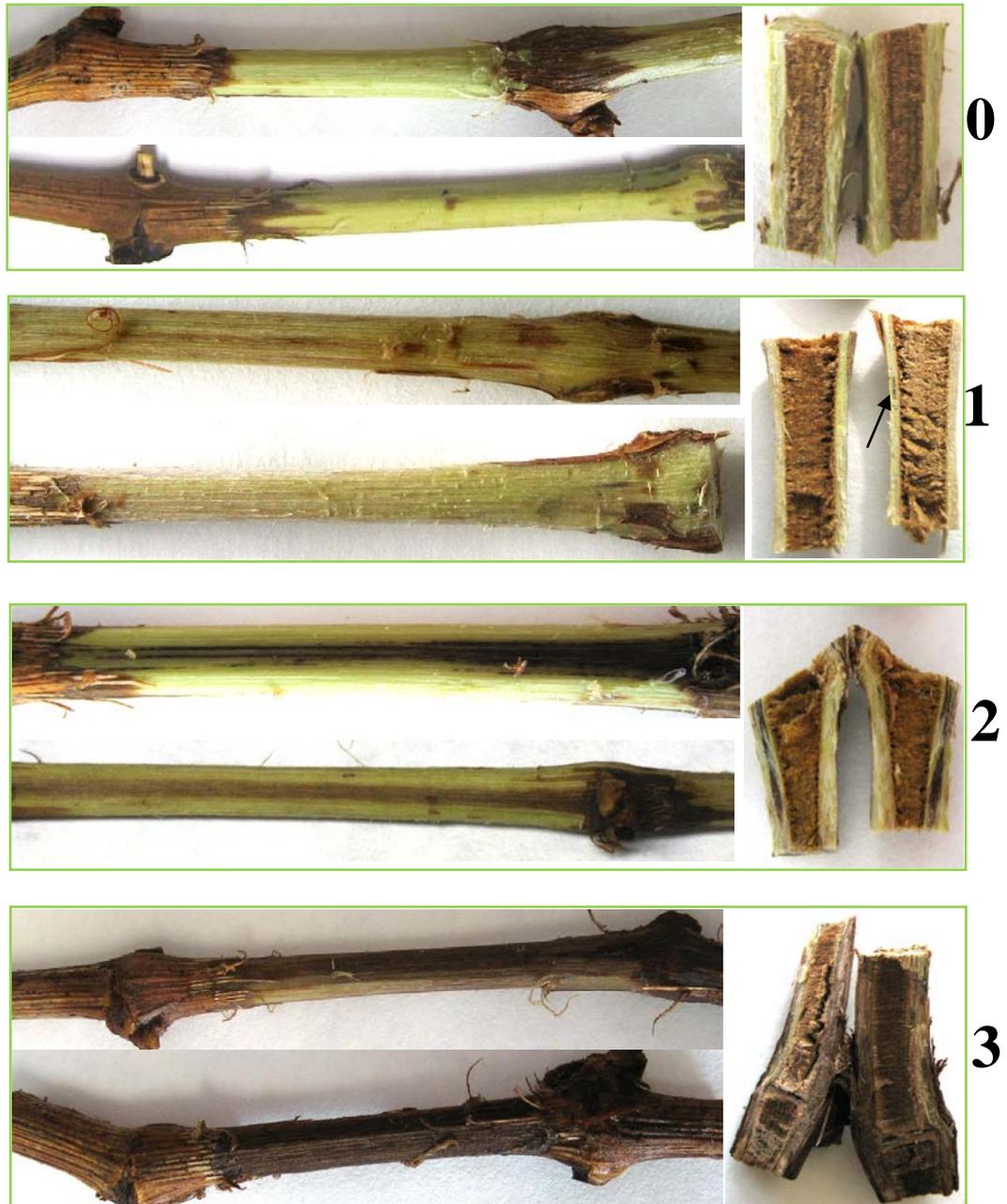


Figura 4.3.2. Aspecto de los sarmientos verdes inoculados con *Pm. aleophilum* y escala de síntomas utilizada en este trabajo para calcular el índice de McKinney. La flecha indica una necrosis incipiente.

La Figura 4.3.3 muestra los resultados del índice de McKinney calculado para valorar la intensidad de los síntomas ocasionados por cada monospórico de *Pm. aleophilum* en los sarmientos verdes inoculados.

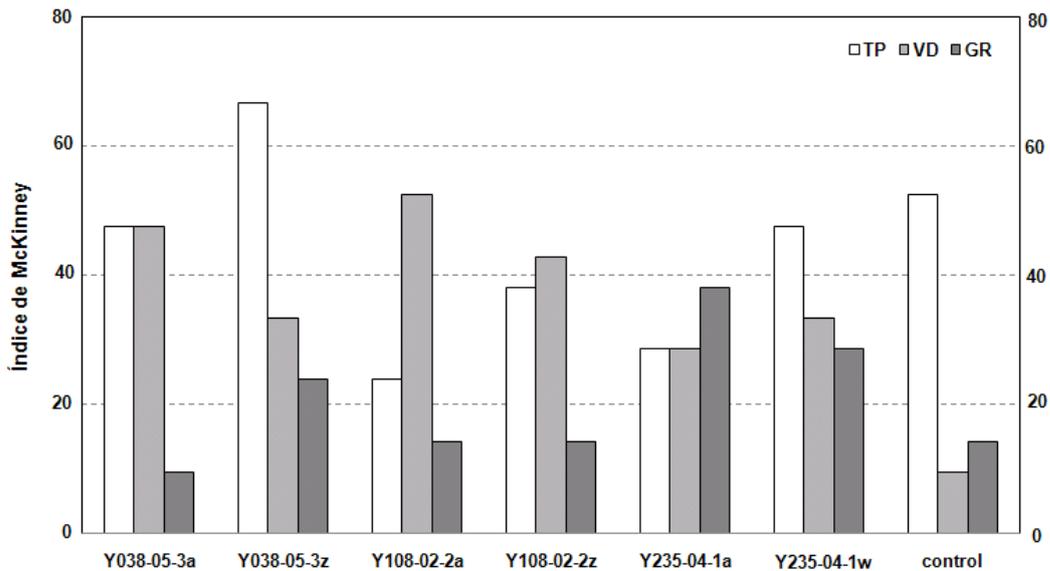


Figura 4.3.3. Gráfico construido con los valores del índice de McKinney obtenidos en el análisis de sarmientos verdes inoculados con *Pm. aleophilum*. TP: Tempranillo; VD: Verdejo y GR: Garnacha.

Todos los monospóricos de *Pm. aleophilum* produjeron lesiones vasculares en sarmientos de vid. Sin embargo, también se encontraron síntomas en los sarmientos control (Tempranillo) (Figura 4.3.3), que estuvieron relacionados con el aislamiento de otras especies fúngicas de naturaleza saprófita.

Respecto a la susceptibilidad de las tres variedades ensayadas los valores del índice de McKinney tendieron a ser superiores en las variedades Tempranillo y Verdejo, y menores en la variedad Garnacha. El análisis de regresión simple ($P = 0,33$) demostró que no existía una relación estadísticamente significativa entre el índice de severidad (re-aislamiento de *Pm. aleophilum*) (Figura 4.3.1) y el índice de McKinney (síntomas observados) (Figura 4.3.3).

4.3.1.2. Plantas injertadas

La patogenicidad y el grado de virulencia de seis cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum* fue evaluada mediante la inoculación de plantas injertadas de las variedades Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura. Las plantas inoculadas fueron observadas regularmente durante cuatro meses para determinar la evolución de la enfermedad mediante el fallo en la brotación de

yemas, la aparición de síntomas foliares o la muerte de la planta. Transcurrido ese periodo se calcularon el índice de severidad, basado en el re-aislamiento del patógeno, y el índice de McKinney, basado en la intensidad de las lesiones vasculares. Adicionalmente se anotó el número de plantas que formaron un chancro en el punto de inoculación.

En conjunto *Pm. aleophilum* fue re-aislado a partir del 51,2% de las plantas inoculadas con esta especie. El re-aislamiento de *Pm. aleophilum* fue mayor en la madera lignificada de un año (37,5%) que en el nuevo pámpano crecido después de la inoculación (28,6%).

Sin embargo, en la variedad Garnacha cuatro monospóricos (Y038-05-3a, Y038-05-3z, Y108-02-2z e Y235-04-1w) fueron re-aislados únicamente en el pámpano. De modo similar, el monospórico Y038-05-3z fue re-aislado solamente en el pámpano en las variedades Tempranillo y Verdejo. Las diferencias en el índice de severidad derivado del análisis de la madera lignificada y el nuevo pámpano no fueron estadísticamente significativas, por lo que los datos fueron analizados conjuntamente.

Phaeoacremonium aleophilum no fue re-aislado en ninguna de las plantas control (inoculadas con PDA). Sin embargo, Botryosphaeriaceae spp. y *Phaeomoniella chlamydospora* fueron aislados a partir de dos y una planta control, respectivamente. Durante este análisis se detectó la presencia de Botryosphaeriaceae spp. en otras 10 plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*.

Existió un efecto significativo ($P < 0,01$) del cultivo monospórico sobre el índice de severidad en las variedades Garnacha, Verdejo y Viura. En la variedad Tempranillo, también se observó un efecto significativo del factor monospórico, pero con un 95% de confianza ($P = 0,0172$). La Tabla 4.3.2 muestra el índice de severidad resultante para cada monospórico y los resultados del test LSD en cada variedad de vid.

Tabla 4.3.2. Índice de severidad \pm error estándar, obtenido en el análisis de plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*. Las letras iguales de cada columna indican medias que no difieren significativamente ($P < 0,01$; * $P < 0,05$ en Tempranillo) de acuerdo con el test LSD.

Monospórico	Variedad de <i>Vitis vinifera</i>			
	Tempranillo*	Verdejo	Garnacha	Viura
Y038-05-3a	26,2 \pm 11,4ab	2,4 \pm 2,3a	2,4 \pm 2,3a	59,5 \pm 12,0c
Y038-05-3z	28,6 \pm 7,9abc	2,4 \pm 2,3a	2,4 \pm 2,3a	23,8 \pm 9,5abc
Y108-02-2a	57,1 \pm 12,0c	0,0 \pm 0,0a	9,5 \pm 3,4a	11,9 \pm 4,8ab
Y108-02-2z	19,0 \pm 11,7ab	40,5 \pm 14,0b	16,7 \pm 14,1a	14,3 \pm 7,6ab
Y235-04-1a	23,8 \pm 12,0ab	9,5 \pm 3,4a	2,4 \pm 2,3a	40,5 \pm 15,4abc
Y235-04-1w	40,5 \pm 11,5bc	11,9 \pm 9,4a	66,7 \pm 14,0b	47,7 \pm 15,6bc
Control	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a

En la variedad Tempranillo los monospóricos Y108-02-2a e Y235-04-1w mostraron índices de severidad significativamente mayores que el control (57,1 y 40,5, respectivamente), con un 95% de confianza. Para los demás monospóricos los valores del índice de severidad se situaron en torno a 20.

El monospórico Y108-02-2a no fue capaz de infectar plantas de la variedad Verdejo. Sin embargo el índice de severidad del monospórico Y108-02-2z (40,5) fue significativamente superior al tratamiento control y el resto de monospóricos en la variedad Verdejo, con un 99% de confianza.

En la variedad Garnacha y de acuerdo con el test LSD_{0,01}, el índice de severidad del monospórico Y235-04-1w (66,7) fue significativamente superior que el obtenido en el tratamiento control y el resto de monospóricos.

En la variedad Viura se observaron índices de severidad significativamente superiores al tratamiento control para los monospóricos Y038-05-3a e Y235-04-1w (59,5 y 47,4, respectivamente). El monospórico Y235-04-1a presentó un índice de severidad elevado (40,5) aunque su diferencia no fue significativa al 99% de confianza. Los demás monospóricos mostraron índices de severidad menores.

La sensibilidad de las cuatro variedades de *Vitis vinifera* incluidas en el experimento fue comparada mediante un análisis ANOVA unifactorial (factor variedad de vid), realizado de forma independiente para cada monospórico de *Pm. aleophilum*.

Existió un efecto significativo de la variedad de *Vitis vinifera* sobre el índice de severidad de los monospóricos Y108-02-2a, Y038-05-3a e Y235-04-1w con un 99% de confianza ($P < 0,01$). También se observó un efecto significativo al analizar los datos del monospórico Y038-05-3z, pero con un 95% de confianza ($P < 0,0103$). En el caso de los monospóricos Y108-02-2z e Y235-04-1w no existió un efecto significativo ($P > 0,05$) del factor variedad de vid sobre el índice de severidad.

La Figura 4.3.4 muestra gráficamente los resultados de la Tabla 4.3.2 y señala los niveles de significación derivados del test LSD para los cuatro monospóricos de *Pm. aleophilum* en los que se observó un efecto significativo del factor variedad de vid sobre el índice de severidad.

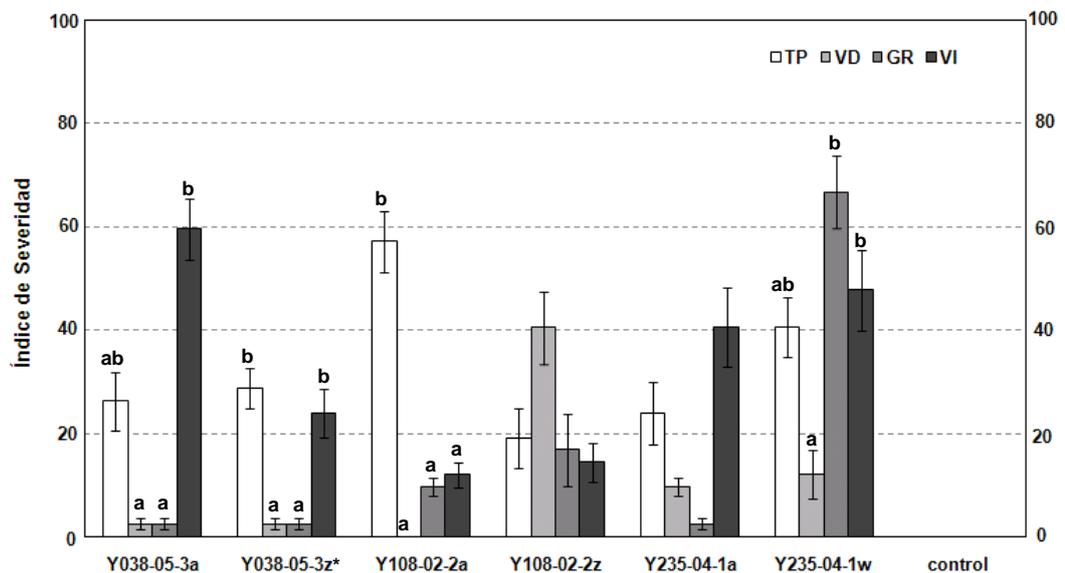


Figura 4.3.4. Gráfico construido con los valores del índice de severidad obtenidos en el análisis de plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*. Las barras indican el error estándar. Las letras iguales sobre las columnas de cada monospórico indican medias que no difieren significativamente ($P < 0,01$; * $P < 0,05$ en Y038-05-3z) de acuerdo con el test LSD. TP: Tempranillo; VD: Verdejo; GR: Garnacha y VI: Viura.

En general las variedades Viura y Tempranillo fueron más susceptibles que las variedades Verdejo y Garnacha a la infección por *Pm. aleophilum*, a pesar de que el mayor índice de severidad correspondió a las plantas de la variedad Garnacha inoculadas con Y235-04-1w.

En la Figura 4.3.5 se pueden observar los síntomas de las plantas inoculadas con *Pm. aleophilum* y la escala utilizada para calcular el índice de McKinney.



Figura 4.3.5. Aspecto de las plantas inoculadas con *Pm. aleophilum* y escala de síntomas utilizada en este trabajo para calcular el índice de McKinney. La flecha indica una necrosis incipiente.

La Figura 4.3.6 muestra los resultados del índice de McKinney calculado para valorar la intensidad de los síntomas ocasionados por cada monospórico de *Pm. aleophilum* en plantas injertadas. Todos los monospóricos de *Pm. aleophilum* produjeron lesiones vasculares en plantas de vid. De acuerdo con los valores del índice de McKinney, el monospórico Y235-04-1w, para el que se obtuvieron los mayores índices de severidad, fue también el que ocasionó los síntomas más severos. En las plantas del tratamiento control la presencia de lesiones vasculares fue mínima.

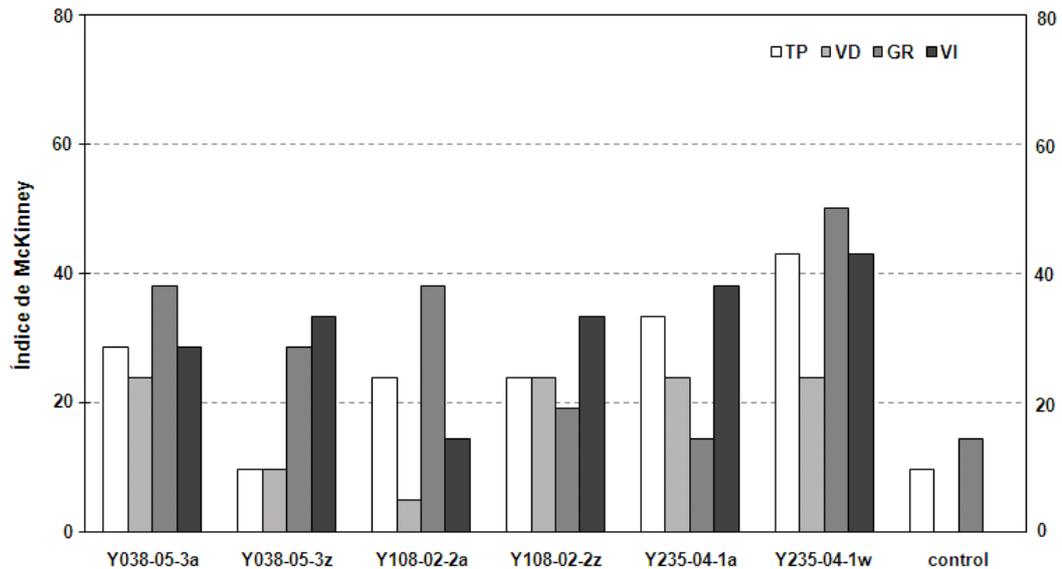


Figura 4.3.6. Gráfico construido con los valores del índice de McKinney obtenidos en el análisis de plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*. TP: Tempranillo; VD: Verdejo; GR: Garnacha y VI: Viura.

Respecto a la susceptibilidad de las variedades ensayadas los valores del índice de McKinney tendieron a ser inferiores en la variedad Verdejo. En el estudio de patogenicidad y virulencia realizado mediante inoculación de plantas injertadas existió una correlación lineal estadísticamente significativa ($P = 0,0008$) entre el índice de severidad (re-aislamiento de *Pm. aleophilum*) (Figura 4.3.4) y los síntomas observados (Figura 4.3.6) definida por la función: Índice de McKinney = $16,26 + 0,39 \times$ Índice de severidad, con $R^2 = 0,36$.

La Tabla 4.3.3 resume los síntomas externos observados en el seguimiento de las plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*. Las variedades blancas (Verdejo y Viura) mostraron un mayor número de plantas con problemas de brotación en sus yemas. Los monospóricos Y038-05-3a e Y038-05-3z fueron capaces de inducir la muerte de cinco y dos plantas, respectivamente. La formación de un chancro en el punto de inoculación fue frecuente y observada también en los tratamientos control. La aparición de síntomas foliares en las plantas control de la variedad Tempranillo se relacionó con el aislamiento de *Botryosphaeriaceae* spp. y *Phaeoconiella chlamyospora*.

Tabla 4.3.3. Síntomas externos observados en las plantas inoculadas con *Pm. aleophilum*. Y: número de plantas con yemas no brotadas por encima de la inoculación. **H:** número de plantas con síntomas de necrosis en las hojas. **M:** número de plantas secas o muertas. **C:** número de plantas en las que se formó chancro en el punto de inoculación.

Monospóricos	Variedad de <i>Vitis vinifera</i>															
	Tempranillo				Verdejo				Garnacha				Viura			
	Y	H	M	C	Y	H	M	C	Y	H	M	C	Y	H	M	C
Y038-05-3a	2	2	1	4	3	1	1	2	4	0	2	1	1	0	1	2
Y038-05-3z	0	0	0	4	2	0	0	4	1	0	1	0	4	0	1	2
Y108-02-2a	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Y108-02-2z	0	0	0	5	3	0	0	2	2	1	0	2	4	0	0	2
Y235-04-1a	1	2	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Y235-04-1w	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Control	0	2	0	2	0	0	0	3	2	0	0	5	3	0	0	2

La Figura 4.3.7 muestra los síntomas foliares observados en plantas inoculadas con el aislado Y038-05-3a (A y D) y dos de los chancros, a veces incipientes, observados en el punto de inoculación.

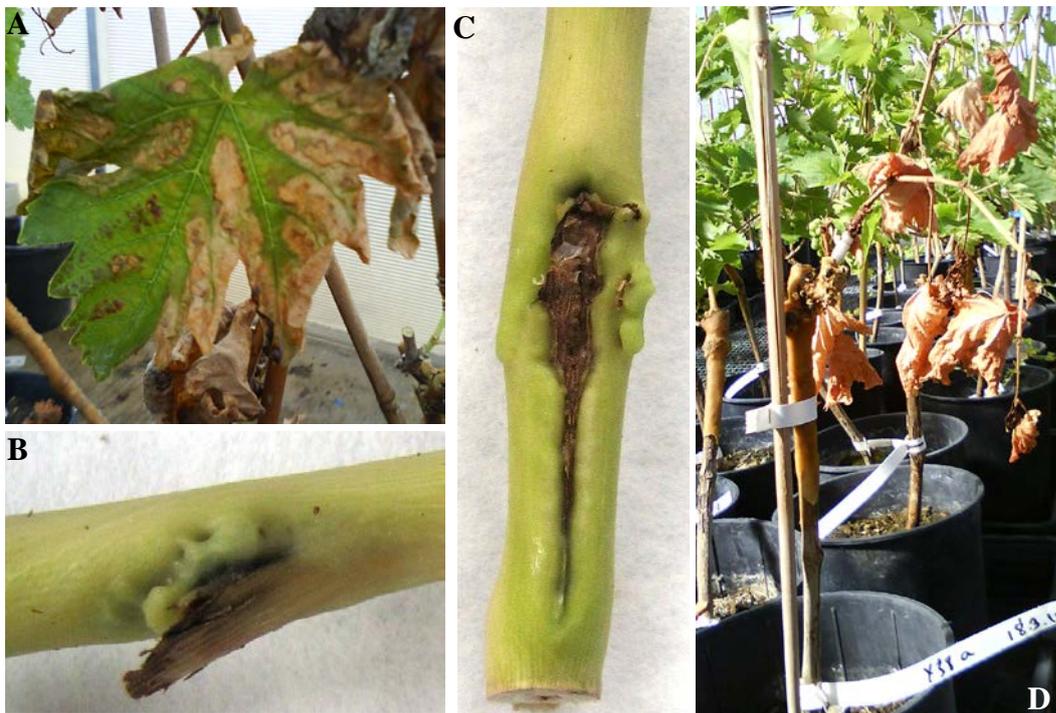


Figura 4.3.7. A: Síntomas foliares observados en la variedad Tempranillo inoculada con el monospóricos Y038-05-3a. **B y C:** Formación de chancro en plantas de las variedades Tempranillo y Verdejo inoculadas con los monospóricos Y108-02-2z e Y038-05-3z, respectivamente. **D:** Síntomas de apoplejía y muerte de una planta de la variedad Verdejo inoculada con el monospóricos Y038-05-3a.

4.3.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

4.3.2.1. Ensayo in vitro

Se descubrió la existencia de aislados sensibles y resistentes al incubar 67 *Pm. aleophilum* en placas con el fungicida Escudo®.

Tabla 4.3.4. Aislados de *Pm. aleophilum* resistentes al fungicida Escudo® y aislados sensibles procedentes de la misma planta. ¹: Aislado CBS631.94 procedente de la colección del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). ²: Aislados procedentes de Castilla y León. R: aislados resistentes; S: aislados sensibles.

Código planta	Origen	Aislados de <i>Pm. aleophilum</i>	Resistencia
-	Italia	CBS631.94 ¹	R
Y038	Valles de Benavente ²	Y038-05-3	R
Y080	Toro ²	Y080-02-1	R
Y082	Toro ²	Y082-02-5	R
Y085	Ribera del Duero ²	Y085-09-1	S
		Y085-12-4	S
		Y085-15-1	S
		Y085-15-2	R
Y086	Toro ²	Y086-15-1	R
Y108	Extremadura	Y108-02-2	R
Y161	Alicante	Y161-17-1	S
		Y161-19-2	R
Y162	Alicante	Y162-06-4	R
Y182	Tierra del Vino de Zamora ²	Y182-01-1	R
		Y182-01-2	R
		Y182-03-1	S
		Y182-03-2	R
		Y182-09-1	S
Y201	Toro ²	Y201-09-1	S
		Y201-16-1	S
		Y201-17-2	R
Y214	Córdoba	Y214-09-3	S
		Y214-19-1	R
Y225	Rueda ²	Y225-01-6	R
Y235	Rueda ²	Y235-04-1	R

Los aislados sensibles crecieron de forma normal en las placas control, pero fueron incapaces de desarrollar micelio en ninguna de las 15 placas que

contenían el fungicida. Los aislados que crecieron en al menos cinco de las placas con Escudo[®] fueron considerados resistentes. En total se encontraron 51 (76%) aislados sensibles y 16 aislados resistentes (24%).

La Tabla 4.3.4 enumera todos los aislados resistentes. Se detectó la presencia de aislados sensibles y resistentes procedentes de una misma planta: Y085, Y161, Y182, Y201 e Y214. Los aislados resistentes de *Pm. aleophilum* resultaron tener diferente origen geográfico dentro de España. También el aislado de referencia CBS631.94, procedente de Italia, mostró capacidad para crecer en presencia de Escudo[®] (Tabla 4.3.4).

De cada uno de los aislados resistentes se obtuvieron 10 cultivos monospóricos, con los cuáles se repitió el ensayo. Se seleccionaron seis aislados para probar la eficiencia de las dos materias activas (carbendazima y flusilazol) que contiene Escudo[®] por separado. Los aislados CBS631.94, Y038-05-3, Y082-02-5, Y108-02-2, Y161-19-2 e Y235-04-1 fueron elegidos por presentar cultivos monospóricos tanto sensibles como resistentes a Escudo[®] (Tabla 4.3.5), además de tener diferente origen geográfico y pertenecer a grupos genotípicos distintos, según los resultados del Capítulo 3.

Tabla 4.3.5. Resultados de los tres ensayos *in vitro* realizados para evaluar la eficiencia de tres fungicidas sobre 12 cultivos monospóricos de *Pm. aleophilum*.

Aislado	Monospórico	<i>In vitro</i>		
		Escudo [®]	Flusilazol	Carbendazima
CBS631.94	CBS 631.94a	S	R	S
	Pal 15b	R	R	R
Y038-05-3	Y038-05-3a	S	R	S
	Y038-05-3z	R	R	R
Y082-02-5	Y082-02-5a	S	R	S
	Y082-02-5z	R	R	R
Y108-02-2	Y108-02-2a	S	R	S
	Y108-02-2z	R	R	R
Y161-19-2	Y161-19-2a	S	R	S
	Y161-19-2z	R	R	R
Y235-04-1	Y235-04-1a	S	R	S
	Y235-04-1w	R	R	R

Los 12 monospóricos analizados fueron resistentes a flusilazol al 0,5%. Seis de los 12 monospóricos analizados mostraron resistencia a carbendazima

al 1%. Los monospóricos sensibles a carbendazima también fueron sensibles a Escudo[®] (Tabla 4.3.5). Estos resultados sugieren que carbendazima es la materia activa responsable de la inhibición del crecimiento de *Pm. aleophilum* en presencia de Escudo[®].

4.3.2.2. Ensayo en sarmientos

La resistencia de *Pm. aleophilum* al fungicida Escudo[®] fue comprobada mediante la inoculación de sarmientos verdes de la variedad Tempranillo impregnados o no con el fungicida. Los datos de las dos repeticiones mostraron ser homogéneos y fueron combinados para realizar el análisis estadístico. El índice de severidad resultante tras el análisis de sarmientos verdes inoculados con tres monospóricos sensibles y tres monospóricos resistentes, fue comparado mediante un análisis ANOVA bifactorial. Existió un efecto significativo ($P < 0,01$) del factor monospórico y del factor fungicida sobre el índice de severidad. La interacción entre ambos factores también fue estadísticamente significativa. La Figura 4.3.8 muestra los resultados del análisis $LSD_{0,01}$ para el factor monospórico en los dos tipos de sarmientos.

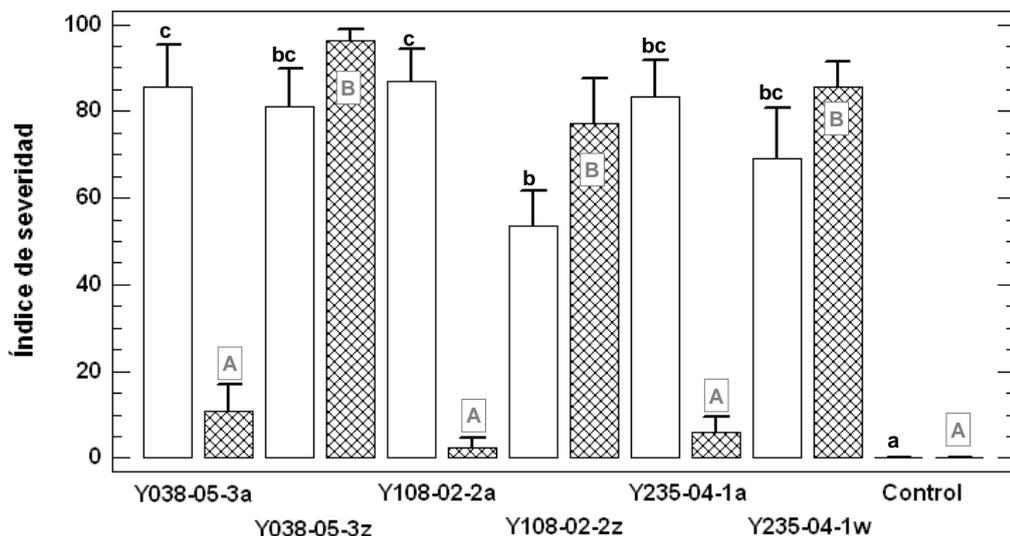


Figura 4.3.8. Índice de severidad calculado a partir de la inoculación con *Pm. aleophilum* de sarmientos verdes de la variedad Tempranillo impregnados o no con fungicida. Las letras minúsculas iguales sobre las columnas blancas indican medias que no difieren significativamente ($P < 0,01$) de acuerdo con el test LSD, en los sarmientos sin fungicida. Las letras mayúsculas iguales de las columnas con trama indican medias que no difieren significativamente ($P < 0,01$) de acuerdo con el test LSD, en los sarmientos impregnados con Escudo[®].

Los resultados obtenidos en el análisis de sarmientos verdes de la variedad Tempranillo sin fungicida han sido previamente detallados en el apartado 4.3.1.1 (Tabla 4.3.1). En los sarmientos impregnados con Escudo[®], el índice de severidad de los tres monospóricos sensibles (Y038-05-3a, Y108-02-2a e Y235-04-1a) no fue significativamente diferente del encontrado en los sarmientos control. Mientras el índice de severidad de los tres monospóricos resistentes (Y038-05-3z, Y108-02z e Y235-04-1w) fue significativamente mayor (Figura 4.3.8).

4.3.2.3. Análisis genético

i. AFLP

Las 64 combinaciones de oligonucleótidos empleadas para caracterizar genéticamente seis monospóricos sensibles y seis monospóricos resistentes a fungicidas, generaron 992 marcadores polimórficos. La Figura 4.3.9 ilustra el dendograma resultante, basado en el coeficiente de similitud.

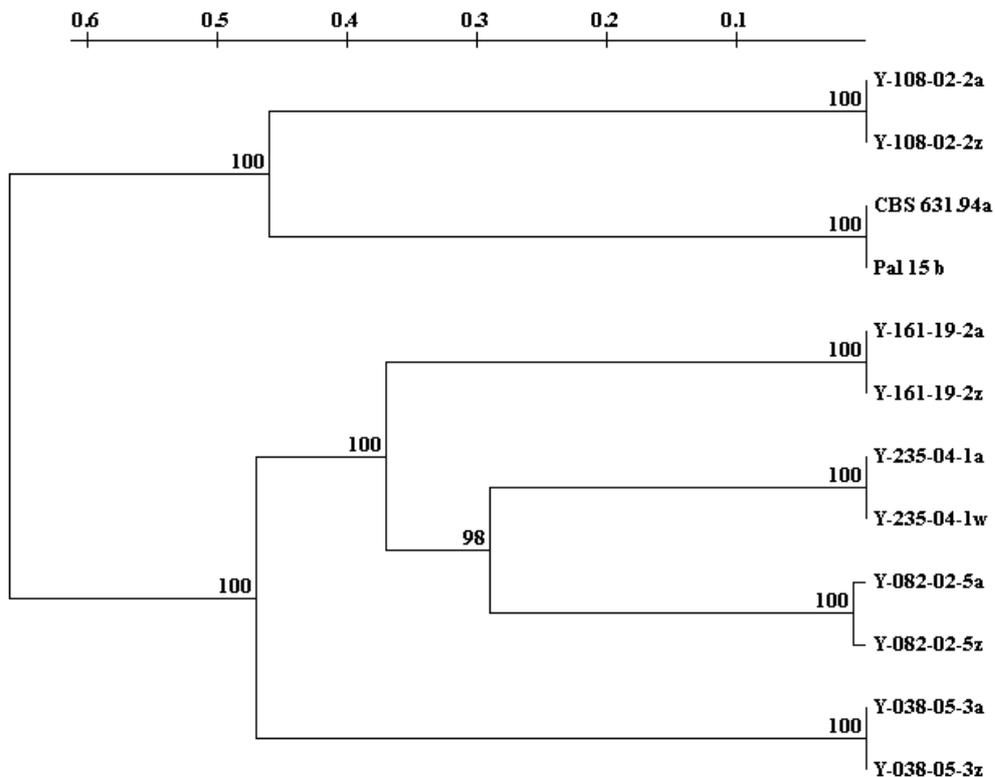


Figura 4.3.9. Dendograma construido a partir del coeficiente de similitud calculado según Nei & Li (1979) con la matriz de datos binarios basada en 992 marcadores AFLP polimórficos de 12 monospóricos de *Pm. aleophilum* (6 sensibles y 6 resistentes). Los números en los nodos revelan los valores de bootstrap obtenidos.

El número medio de fragmentos amplificados por combinación fue de 15,5. El menor número de marcadores fue encontrado con la combinación *EcoRI*-T/*MseI*-CG (3), mientras el número máximo de marcadores correspondió a la combinación de oligonucleótidos *EcoRI*-AC/*MseI*-A (39). Dependiendo de la combinación empleada, se encontraron entre cuatro y seis haplotipos diferentes (Tabla 4.3.6).

Tabla 4.3.6. Número de fragmentos amplificados y número de perfiles genéticos generados en el análisis genético de *Pm. aleophilum* resistentes a fungicidas mediante AFLP. Np: nº de fragmentos polimórficos, Nh: nº de haplotipos diferentes.

Combinación		Np	Nh	Combinación		Np	Nh
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>			<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>		
A	A	16	6	AA	A	9	6
A	C	22	6	AA	C	16	6
A	G	16	6	AA	G	10	6
A	T	19	6	AA	T	19	6
A	CA	25	6	AA	CA	25	6
A	CC	19	5	AA	CC	13	6
A	CG	34	6	AA	CG	13	6
A	CT	20	6	AA	CT	17	6
C	A	19	6	AC	A	39	6
C	C	8	5	AC	C	21	6
C	G	4	6	AC	G	17	6
C	T	5	6	AC	T	25	6
C	CA	20	6	AC	CA	19	6
C	CC	4	4	AC	CC	13	6
C	CG	14	6	AC	CG	13	6
C	CT	21	6	AC	CT	16	6
G	A	21	6	AG	A	20	6
G	C	11	6	AG	C	22	6
G	G	7	6	AG	G	17	6
G	T	16	6	AG	T	23	6
G	CA	22	6	AG	CA	19	6
G	CC	6	6	AG	CC	9	6
G	CG	16	6	AG	CG	12	6
G	CT	14	6	AG	CT	9	6
T	A	18	6	AT	A	19	6
T	C	21	6	AT	C	6	6
T	G	19	6	AT	G	7	6
T	T	16	6	AT	T	14	6
T	CA	12	6	AT	CA	17	6
T	CC	7	5	AT	CC	6	5
T	CG	3	4	AT	CG	14	6
T	CT	4	4	AT	CT	14	6

Los monospóricos de *Pm. aleophilum* resistentes a fungicidas (Pal 15b, Y038-05-3z, Y082-02-5a, Y108-02-2z, Y161-19-2z e Y235-04-1w) no se agruparon independientemente de los monospóricos sensibles (CBS631.94a,

Y038-05-3a, Y082-02-5a, Y108-02-2a, Y161-19-2a e Y235-04-1a). Solamente los monospóricos Y082-02-5a e Y082-02-5z presentaron ocho marcadores diferentes obtenidos con la combinación *EcoRI*-AC/*MseI*-C. La Figura 4.3.9 muestra los valores de bootstrap obtenidos, y la consistencia de dos grupos genotípicos diferenciados que concuerdan con los resultados expuestos en el Capítulo 3 de esta memoria.

i. β -tubulina

La amplificación parcial del exón 6 del gen de la β -tubulina con los oligonucleótidos L2 y R1, diseñados en este trabajo, proporcionó un fragmento de más de 652 pb en los 12 monospóricos analizados (Figura 4.3.10).

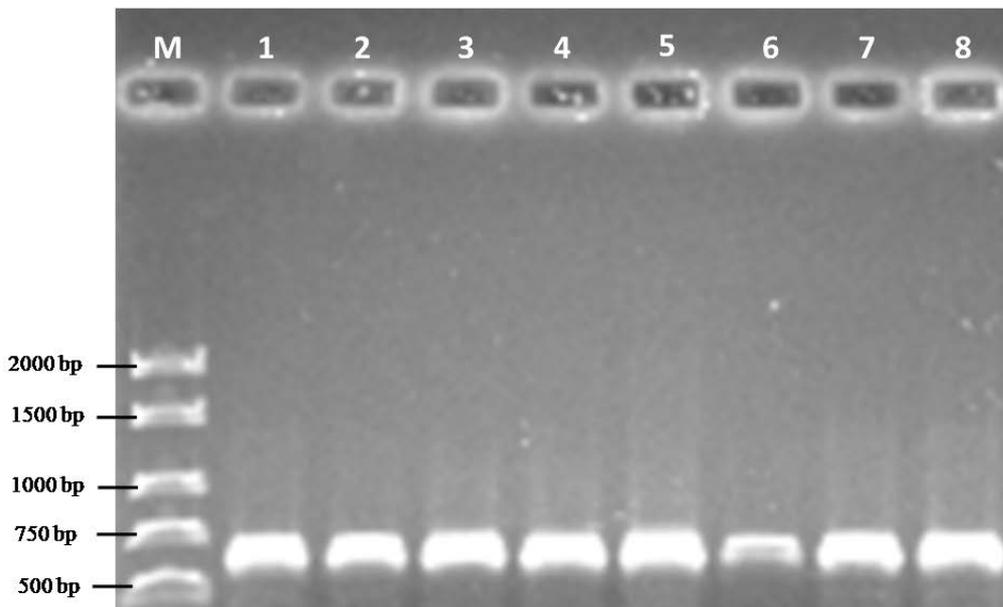


Figura 4.3.10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% TBE en el que se muestran los amplímeros obtenidos con los oligonucleótidos L2 y R1. M: marcador de peso molecular. Carriles 1 a 8: monospóricos de *Pm. aleophilum* (CBS631.94a, Pal15b, Y038-05-3a, Y038-05-3z, Y082-02-5a, Y082-02-5z, Y108-02-2a, Y108-02-2z).

Los dos extremos de la secuencia obtenida se superpusieron con los fragmentos previamente amplificados con los oligonucleótidos T1-Bt2b y Bt1a-Bt1b (Capítulo 3). La nueva región amplificada estuvo formada por 520 nucleótidos, de los cuáles cuatro fueron variables e informativos.

En el alineamiento de los aminoácidos traducidos (173) se constató la existencia de dos mutaciones puntuales que provocaron un cambio en el

aminoácido traducido (Figura 4.3.11). Los monospóricos resistentes Y038-05-3z e Y108-02-2z fueron considerados mutantes de tipo 1 (mt_1) porque mostraron una mutación de GAG (Ácido glutámico) a GGG (Glicina). Y el monospórico resistente Y161-19-2z se consideró mutante de tipo 2 (mt_2) por presentar la mutación de GAG (Ácido glutámico) a AAG (Lisina) en la misma posición. Los monospóricos sensibles conservaron el codón GAG (Ácido glutámico) en todos los casos y fueron considerados como “*wild type*” (Tabla 4.3.7).

Las secuencias casi completas del gen de la β -tubulina (exones 2 a 7) de *Pm. aleophilum* fueron alineadas con la secuencia del GenBank U27198 que pertenece a un aislado resistente al benomilo de *Botryotinia fuckeliana*. De este modo fue posible localizar la mutación observada en el codón 198 (Figura 4.3.11). Mutaciones de esta posición han sido previamente correlacionadas con una elevada resistencia a los benzimidazoles en otros hongos filamentosos.

Las secuencias completas de la β -tubulina correspondiente a los 12 monospóricos analizados (seis sensibles y seis resistentes a fungicidas) fueron introducidas en la base de datos GenBank. Los números de acceso se detallan en la Tabla 4.3.7.

Tabla 4.3.7. Nucleótidos y aminoácidos observados en las posiciones variables del exón 6 del gen de la β -tubulina (amplificado con los oligonucleótidos L2 y R1) de 12 monospóricos de *Pm. aleophilum*. Glu: ácido glutámico. Gly: Glicina. Lys: Lisina. Arg: arginina. ^b: Clasificación de los monospóricos según la mutación encontrada. wt: “*wild type*”. mt_1: mutante tipo 1. mt_2: mutante tipo 2. ^c: Números de acceso a la base de datos Genbank de las secuencias completas del gen de la β -tubulina.

Monospóricos	Codón 198	Codón 213	Codón 219	Grupo^b	Nº GenBank^c
Sensibles					
CBS631.94a	GAG (Glu)	CGU (Arg)	CGU (Arg)	wt	JQ691663
Y038-05-3a	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691665
Y082-02-5a	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691667
Y108-02-2a	GAG (Glu)	CGU (Arg)	CGU (Arg)	wt	JQ691669
Y161-19-2a	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691671
Y235-04-1a	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691673
Resistentes					
Pal15b	GAG (Glu)	CGU (Arg)	CGU (Arg)	wt	JQ691664
Y038-05-3z	GGG (Gly)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	mt_1	JQ691666
Y082-02-5z	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691668
Y108-02-2z	GGG (Gly)	CGU (Arg)	CGU (Arg)	mt_1	JQ691670
Y161-19-2z	AAG (Lys)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	mt_2	JQ691672
Y235-04-1w	GAG (Glu)	CGA (Arg)	CGC (Arg)	wt	JQ691674

	L2					←
Y108-02-2a	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
Y108-02-2z	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
Y161-19-2a	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
Y161-19-2z	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
Y235-04-1a	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
Y235-04-1w	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
U27198	ASGNKYVPRA	VLVDLEPGIM	DAVRAGPFGQ	LFRPDNFVFG	QSGAGNNWAK	
	Bt2b					
Y108-02-2a	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y108-02-2z	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y161-19-2a	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y161-19-2z	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y235-04-1a	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y235-04-1w	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
U27198	← - - -	GHYTEGAEIV	DQVLDVVRRE	AEGCDCLQGF	QITHSLGGGT	GAGMGILLIS
Y108-02-2a		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y108-02-2z		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y161-19-2a		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y161-19-2z		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y235-04-1a		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y235-04-1w		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
U27198		KIREEFPPDRM	MATFSVVPSP	KVSDTVVEPY	NATLSVHQLV	ENSD E TFCID
Y108-02-2a		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
Y108-02-2z		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
Y161-19-2a		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
Y161-19-2z		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
Y235-04-1a		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
Y235-04-1w		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNYLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
U27198		NEALYDICMR	TLKLSNPSYG	DLNHLVSAMV	SGVITCLRFP	GQLNSDLRKL
	Bt1a			R1		
Y108-02-2a	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
Y108-02-2z	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
Y161-19-2a	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
Y161-19-2z	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
Y235-04-1a	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
Y235-04-1w	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	FDPKNMMAAS
U27198	- - - -	AVNMVFPFRL	HFFMVGAFPL	TSRGAHSFRA	VIVPELTQQM	YDPKNMMAAS
Y108-02-2a		DFRNGRYLTC	SAI			
Y108-02-2z		DFRNGRYLTC	SAI			
Y161-19-2a		DFRNGRYLTC	SAI			
Y161-19-2z		DFRNGRYLTC	SAI			
Y235-04-1a		DFRNGRYLTC	SAI			
Y235-04-1w		DFRNGRYLTC	SAI			
U27198		DFRNGRYLTC	SAI			

Figura 4.3.11. Alineamiento de los aminoácidos del exón 6 del gen de la β -tubulina. Los nuevos oligonucleotidos L2 y R1 se indican con una flecha continua. Los oligonucleótidos Bt2b y Bt1a (Glass & Donaldson, 1995) se indican con una flecha de trazo discontinuo.

La Figura 4.3.11 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondientes al exón 6 del gen de la β -tubulina de seis monospóricos de *Pm. aleophilum* con la secuencia U27198. En la figura se localizan tanto la mutación del codón 198 en los tres monospóricos resistentes como los nuevos oligonucleótidos diseñados en este trabajo.

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Patogenicidad y virulencia de *Pm. aleophilum*

En este capítulo seis monospóricos de *Pm. aleophilum* fueron sometidos a ensayos de patogenicidad y virulencia mediante la inoculación de dos tipos de material vegetal de *Vitis vinífera*. Coincidiendo con lo publicado por otros investigadores (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007; Zanzotto *et al.*, 2008; Laveau *et al.*, 2009; Aroca & Raposo, 2009) *Pm. aleophilum* provocó los síntomas típicos de los decaimientos de la vid y fue re-aislado a partir del material vegetal inoculado. Por lo tanto, siguiendo los postulados de Koch, se ha confirmado que todos los monospóricos de *Pm. aleophilum* estudiados son patógenos de vid.

El re-aislamiento y las lesiones vasculares ocasionadas por *Pm. aleophilum* fueron superiores en sarmientos verdes que en plantas injertadas. Estos resultados junto con otras ventajas como la facilidad de manejo y el menor coste, sugieren que los sarmientos verdes constituyen un material útil para el desarrollo de experimentos de patogenicidad en *Vitis vinífera*.

Sin embargo, al contrario de lo observado en plantas injertadas, no existió una relación estadísticamente significativa entre el índice de severidad y el índice de McKinney. Este resultado puede explicarse en parte por el aislamiento de otros hongos saprófitos, que pueden contribuir al desarrollo de los síntomas, dado que algunos sarmientos control también presentaron lesiones vasculares. Laveau *et al.*, (2009) también describieron el re-aislamiento de hongos saprófitos en los esquejes utilizados para ensayar la agresividad de distintas especies de hongos asociados a los decaimientos de la vid. Según estos autores los hongos saprófitos pueden competir con los

implicados en los decaimientos de la vid. Sin embargo, los elevados valores de re-aislamiento de *Pm. aleophilum* encontrados en este trabajo indican que su crecimiento no fue reducido por la presencia de otras especies fúngicas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación en sarmientos verdes han puesto de manifiesto una gran capacidad de *Pm. aleophilum* para infectar y propagarse en este material. Confirmando de este modo que los restos de poda son una fuente de inóculo en parcelas afectadas. Este hecho resalta la importancia de retirar toda la madera de poda para conseguir un manejo eficiente y preventivo de los decaimientos de la vid.

La utilización de sarmientos verdes permitió analizar la patogenicidad y virulencia, en base a las lesiones vasculares, de seis monospóricos de *Pm. aleophilum*, en un periodo más corto (2 meses) que utilizando plantas injertadas (4 meses). Pero, obviamente parámetros como los síntomas en hojas o la brotación de yemas fueron únicamente evaluables mediante la inoculación de plantas.

Varios autores han fallado en la reproducción de síntomas foliares mediante inoculación de esquejes enraizados con *Pm. aleophilum* (Laveau *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010); otros han encontrado síntomas foliares en plantas inoculadas transcurridos dos o tres años (Sparapano *et al.*, 2001; Feliciano *et al.*, 2004). Los resultados de este trabajo concuerdan con los encontrados por Aroca & Raposo (2009), confirmando la capacidad de *Pm. aleophilum* para inducir, en pocos meses, la expresión de síntomas foliares, aunque a niveles estadísticamente no significativos.

Como apuntaron estos mismos autores, es probable que se necesiten periodos de tiempo más largos para observar síntomas significativos en hojas de plantas infectadas (Aroca & Raposo, 2009). Aunque otros factores distintos pueden condicionar la expresión de síntomas externos (Laveau *et al.*, 2009), ya que estudios de campo han demostrado que no existe correlación significativa entre la severidad de las lesiones vasculares y los síntomas foliares (Calzarano & Di Marco, 2007).

El método de inoculación empleado, basado en el contacto entre el micelio fúngico y la madera en heridas, ha mostrado ser suficiente para

permitir la penetración y el avance de *Pm. aleophilum* a través de la madera lignificada y los brotes anuales. Numerosos trabajos han demostrado previamente la eficiencia de esta metodología (Feliciano *et al.*, 2004; Eskalen *et al.*, 2007; Zanzotto *et al.*, 2008; Laveau *et al.*, 2009). Entre las ventajas del método empleado se pueden señalar su facilidad metodológica y la similitud con lo que se postula que sucede en la naturaleza.

Algunos autores han propuesto métodos de inoculación basados en técnicas de vacío que garantizan una distribución homogénea de los conidios fúngicos en todo el sistema vascular (Aroca & Raposo, 2009; Gramaje *et al.*, 2010). En este trabajo ha sido posible el re-aislamiento de *Pm. aleophilum* en los nuevos órganos vegetativos de la planta, lo que demuestra la capacidad del hongo para moverse en el interior de la planta, sin necesidad de alterar el sistema vascular de la planta.

El grado de patogenicidad y virulencia expresado por cada monospórico de *Pm. aleophilum* no ha sido homogéneo y se ha visto influido tanto por la variedad de vid como por el tipo de material vegetal inoculado. Sin embargo, se han encontrado determinadas diferencias estadísticamente significativas que han permitido relacionar el grado de virulencia con la variabilidad genética intra-específica de *Pm. aleophilum*.

Los monospóricos del primer grupo genotípico (Y108-02-2a e Y108-02-2z) mostraron un grado de virulencia intermedio tanto en sarmientos como en plantas injertadas. En ambos casos el índice de severidad del monospórico Y108-02-2a fue significativamente superior en la variedad Tempranillo, de la cuál procedían originalmente.

En general los *Pm. aleophilum* clasificados en el segundo grupo genotípico, manifestaron el menor grado de virulencia. Los monospóricos Y235-04-1a e Y235-04-1w, procedentes de la variedad Verdejo, tuvieron un comportamiento desigual. El monospórico Y235-04-1w fue notablemente más virulento en plantas injertadas que en sarmientos.

Los monospóricos pertenecientes al tercer grupo genotípico (Y038-05-3a e Y038-05-3z) mostraron el máximo grado de virulencia. Fueron los

monospóricos re-aislados con mayor frecuencia en sarmientos y los únicos capaces de producir la muerte en plantas inoculadas.

Los resultados obtenidos contrastan con los publicados por otros autores (Laveau *et al.*, 2009), que no encontraron diferencias en el grado de virulencia dentro de la especie *Pm. aleophilum*. En este trabajo se ha relacionado por primera vez la variabilidad genotípica con la capacidad patogénica y el grado de virulencia de *Pm. aleophilum*.

Todas las variedades de *Vitis vinifera* evaluadas fueron susceptibles a la inoculación con *Pm. aleophilum*, impidiendo concluir que alguna de ellas sea resistente. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por diferentes autores en otras zonas vitivinícolas (Sparapano *et al.*, 2001; Feliciano *et al.*, 2004).

No obstante, los resultados de este trabajo indican que las variedades Verdejo y Garnacha son menos susceptibles que las variedades Tempranillo y Viura a la infección por *Pm. aleophilum*. En sarmientos verdes no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades Tempranillo, Verdejo y Garnacha, aunque los mayores valores del índice de severidad y de McKinney correspondieron a la variedad Tempranillo. En plantas injertadas, el re-aislamiento de tres de los seis monospóricos de *Pm. aleophilum* fue significativamente mayor en las variedades Tempranillo y/o Viura. Este es el primer trabajo de investigación dirigido a esclarecer la susceptibilidad de las variedades Tempranillo, Verdejo y Viura a la infección por *Pm. aleophilum*.

De forma puntual el monospórico Y235-04-1w proporcionó los valores máximos de patogenicidad y virulencia en la variedad Garnacha. Feliciano *et al.*, (2004) analizaron la susceptibilidad de tres variedades de vid a *Pm. aleophilum*, observando una menor expresión de los síntomas de yesca en las variedades Garnacha y Cabernet-Sauvignon que en la variedad Thompson Seedless. Los resultados obtenidos para la variedad Garnacha en este trabajo concuerdan con los publicados por Feliciano *et al.*, (2004), aunque otros trabajos han demostrado que la variedad Garnacha muestra síntomas más severos que las variedades Cabernet-Sauvignon y Merlot tras la inoculación con *Eutypa lata* (Sosnowski *et al.*, 2007). Nuevas investigaciones podrán confirmar la relación entre la variabilidad genética intra-específica y la

patogenicidad o virulencia de *Pm. aleophilum*, así como la susceptibilidad de distintas variedades de vid.

4.4.2. Resistencia a fungicidas de *Pm. aleophilum*

Las industrias químicas tienden a diseñar fungicidas comerciales que contienen varias materias activas pertenecientes a diferentes grupos químicos. Esta estrategia ha sido promovida por dos razones fundamentales: prevenir la aparición de resistencias y favorecer la acción sinérgica de los componentes. El efecto de Escudo[®], un fungicida compuesto por un bencimidazol (carbendazima) y un esteroles DMI-triazol (flusilazol), contra *Pm. aleophilum* ha sido investigada en este Capítulo. Por primera vez, se ha descubierto la existencia de aislados de *Pm. aleophilum* resistentes a este fungicida en el campo español. Resultados similares no han sido publicados para ninguna otra región del mundo.

Escudo[®] inhibió el crecimiento de la mayoría de los aislados ensayados, pero el 24% de ellos fueron resistentes. La resistencia a Escudo[®], puede estar presente también en otros países, como se demuestra mediante la clasificación del aislado CBS631.94, procedente de Italia, entre los resistentes.

En este trabajo también se ha analizado el efecto individual de carbendazima y flusilazol sobre 12 monospóricos de *Pm. aleophilum*. Todos los monospóricos fueron resistentes a flusilazol. Lo que demuestra la baja efectividad de este DMI-triazol en el control de *Pm. aleophilum*.

El bencimidazol carbendazima, utilizado de forma individual, inhibió completamente el crecimiento de seis monospóricos de *Pm. aleophilum*, los mismos que fueron sensibles a la acción de Escudo[®]. Los otros seis monospóricos estudiados fueron resistentes tanto a carbendazima de forma individual como a Escudo[®]. Estos resultados indican claramente que la acción de Escudo[®] es debida a la presencia de carbendazima como materia activa, más que al efecto sinérgico de combinar un bencimidazol y un DMI-triazol en su fórmula. Los resultados obtenidos coinciden con los publicados por otros autores (Gramaje *et al.*, 2009), quienes probaron 14 fungicidas *in vitro* contra *Pm. aleophilum* y encontraron que carbendazima fue uno de los dos fungicidas más eficientes para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas.

En este trabajo se han encontrado aislados sensibles y resistentes en una misma planta de vid, e incluso monospóricos sensibles y resistentes procedentes de un único aislado. Estos resultados ponen de manifiesto el peligro de que los aislados resistentes lleguen a ser dominantes en una población sometida al efecto del fungicida a lo largo del tiempo. El conocimiento de la forma teleomórfica de *Pm. aleophilum* (Mostert *et al.*, 2003) y el descubrimiento de cuerpos fructíferos de *T. minima* en viñedos (Rooney-Latham *et al.*, 2005), debe ser considerado como un factor determinante en la propagación de la resistencia de esta especie.

Además de los aislados de *Pm. aleophilum* estudiados, en este trabajo se ha observado la resistencia de otras especies del género como *Pm. scolyti* y *Pm. parasiticum*. Estas observaciones sugieren que la capacidad de resistencia a fungicidas puede ser recurrente entre *Phaeoacremonium* spp. En la actualidad 25 especies distintas de *Phaeoacremonium* han sido aisladas de *Vitis vinifera*, lo que ofrece nuevas vías de investigación.

El ensayo de AFLP mostró una amplia variabilidad genética (992 marcadores polimórficos) entre los 12 monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados y la existencia de dos grupos consistentes. Sin embargo, utilizando la técnica AFLP, no se encontraron diferencias significativas entre los monospóricos sensibles y resistentes. Los grupos establecidos coincidieron con los definidos en el Capítulo 3 de esta memoria. Los dos monospóricos (uno sensible y uno resistente) procedentes de un mismo aislado, mostraron una gran homología y se agruparon conjuntamente.

Hamamoto *et al.* (2000) descubrieron la existencia de una unidad repetida de 126 pb en la región promotora del gen CYP51A1 que provocaba la sobre-expresión del gen y confería resistencia a DMI en *Penicillium digitatum*. De modo similar, los aislados DMI-resistentes de *Venturia inaequalis* analizados por Schnabel & Jones (2001), presentaron una inserción de 553 pb localizada en la región promotora del gen CYP51 que fue responsable de su sobre-expresión. Por su parte, Délye *et al.* (1997) estudiaron la resistencia de *Uncinula necator* a los DMI y hallaron una mutación puntual responsable de un cambio en la secuencia de aminoácidos. En este trabajo los 12 monospóricos de *Pm. aleophilum* analizados fueron resistentes a un esterol

DMI-triazol (flusilazol), por lo tanto no se pudieron observar diferencias entre los sensibles y resistentes en el patrón de marcadores AFLP. Se necesitan nuevas investigaciones moleculares del gen CYP51 de *Pm. aleophilum* para determinar cuál es el mecanismo que confiere la resistencia a los DMI en esta especie.

La resistencia a los bencimidazoles se ha asociado mayoritariamente con mutaciones puntales del gen de la β -tubulina (Ma & Michailides, 2005). En el Capítulo 3 de esta memoria se han estudiado dos regiones parciales del gen de la β -tubulina, pero los resultados no evidenciaron la presencia de mutaciones en los monospóricos resistentes a Escudo[®] y carbendazima.

En el presente Capítulo se ha diseñado un nuevo par de oligonucleótidos (L2-R1) que ha permitido amplificar con éxito la región del exón 6 del gen de la β -tubulina de *Pm. aleophilum*. El análisis de las secuencias obtenidas mostró la existencia de una mutación puntual en el codón 198, presente en tres de los seis monospóricos resistentes. Dos tipos de mutantes diferentes fueron caracterizados por el re-emplazamiento de ácido glutámico por glicina (mt_1) o lisina (mt_2).

La relación directa entre este tipo de mutación localizada en el codón 198 y la resistencia a los bencimidazoles ha sido previamente confirmada por otros autores (Fujimura *et al.*, 1992; Hollomon *et al.*, 1998). Los resultados de este trabajo coinciden con los observados en aislados resistentes a los bencimidazoles en numerosas especies fúngicas, incluidas *Botrytis cinerea* (Yarden & Katan, 1993); *Tapesia acuformis*, *T. yallundae*, *Venturia inaequalis*, *Monilinia fruticula*, *Penicillium aurantiougriseum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, and *Sclerotinia homoeocarpa* (Ma & Michailides, 2005).

Los resultados del presente trabajo indican una posible correlación entre la mutación del codón 198 del gen de la β -tubulina y la resistencia a carbendazima de *Pm. aleophilum*. Sin embargo, estos resultados también sugieren que esta mutación puntual no es suficiente para explicar el mecanismo de resistencia a los bencimidazoles en *Pm. aleophilum*. Porque tres de los monospóricos resistentes no presentaron ninguna alteración en el codón 198 del gen de la β -tubulina. Kawchuk *et al.* (2002) encontraron que la secuencia de aminoácidos del gen de la β -tubulina era idéntica en aislados de *Gibberella*

pulicaris sensibles y resistentes a tiabendazol. Por lo tanto, deben existir otros mecanismos moleculares todavía desconocidos que confieren resistencia a los bencimidazoles en *Pm. aleophilum* y *G. pulicaris*.

La viabilidad ecológica de los aislados resistentes a fungicidas determinará la presencia de los genotipos resistentes en el campo una vez que han sido seleccionados. En ocasiones los aislados fúngicos resistentes pueden ser menos viables que los aislados sensibles y no pueden sobrevivir en ausencia de la presión selectiva que ejerce el fungicida (Koenraadt *et al.*, 1992). Para dilucidar si esta situación ocurre con los monospóricos resistentes de *Pm. aleophilum* descubiertos en esta investigación, se ha llevado a cabo un experimento de inoculación de sarmientos de *Vitis vinifera* (cv. Tempranillo) con monospóricos sensibles y resistentes.

Todos los monospóricos fueron capaces de infectar la madera de vid sin fungicida, lo que indica que la viabilidad y agresividad de los monospóricos resistentes no decrece en ausencia del fungicida. Pero solamente los monospóricos resistentes fueron capaces de infectar la madera de vid impregnada con Escudo[®]. Estos resultados confirmaron la resistencia de los monospóricos previamente observada durante los ensayos *in vitro* realizados en medio de cultivo PDA.

Mediante los ensayos de inoculación, no se observó una correlación entre la resistencia a Escudo[®] y el grado de virulencia o agresividad de los seis monospóricos analizados. Los resultados obtenidos sugieren que la agresividad tiene un soporte genético diferente de la resistencia a Escudo[®] y carbendazima.

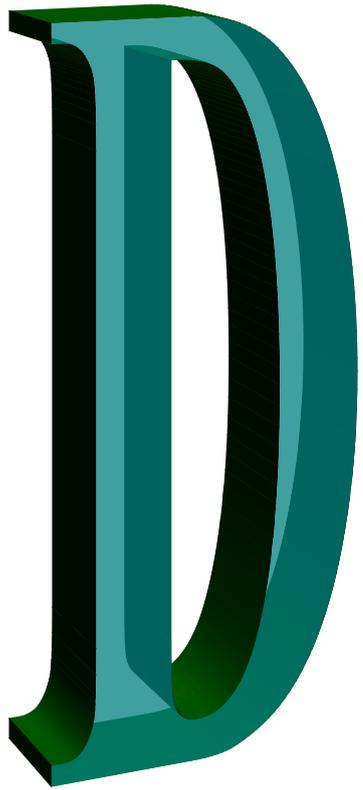
En resumen, en este Capítulo se ha demostrado la patogenicidad de *Pm. aleophilum* y la existencia de diferentes grados de virulencia. Por primera vez se ha relacionado el grado de virulencia de *Pm. aleophilum* con su variabilidad genética intra-específica. Se ha visto que las variedades Tempranillo y Viura son más susceptibles a *Pm. aleophilum* que las variedades Garnacha y Verdejo. Existen aislados resistentes a fungicidas en los viñedos españoles y se ha descubierto la presencia de mutaciones puntuales en el codón 198 del gen de la β -tubulina que confieren resistencia de *Pm. aleophilum* a los bencimidazoles. Los ensayos de inoculación han demostrado que los monospóricos sensibles y resistentes tienen una capacidad patogénica similar.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini, C., Gredt, M. & Leroux, P. (2003). Polymorphism of the 14 α -demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acutiformis* and *Tapesia yallundae*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 117-128.
- Agrios, G. (1969). *Plant Pathology*. APS Press, New York (EE.UU.) 629 pp.
- Aroca, A. & Raposo, R. (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* Species on Grapevines. *Journal of Phytopathology*, 157: 413-419.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P. & Pratella, G.C. (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears, pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*, 52: 362-370.
- Calzarano, F. & Di Marco, S. (2007). Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 96-101.
- Délye, C., Laigret, F. & Corio-Costet, M.F. (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2966-2970.
- Eskalen, A., Feliciano, A.J. & Gubler, W.D. (2007). Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*, 91: 1100-1104.
- Feliciano, A.J., Eskalen, A. & Guber, W.D. (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 66-69.
- Fujimura, M., Oeda, K., Inoue, H. & Kato, T. (1992). A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Current Genetics*, 21: 399-404.
- Gramaje, D., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2009). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine process. *Crop Protection*, 28: 1091-1097.
- Gramaje, D., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2010). Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 512-520.

- Halleen, F., Fourie, P.H. & Crous, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56: 637-645.
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K. & Hibi, T. (2000). Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3421-3426.
- Hollomon, D.W., Butters, J.A., Barker, H. & Hall, L. (1998). Fungal β -tubulin, expressed as fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2171-2173.
- Kawchuk, L.M., Hutchison, L.J., Verhaeghe, C.A., Lynch, D.R., Bains, P.S. & Holley, J.D. (2002). Isolation of the β -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. *Can. J. Plant Pathol.*, 24: 233-238.
- Koenraadt, H., Sommerville, S.C. & Jones, A.L., (1992). Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 82: 1348-1354.
- Larignon, P. & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 147-157.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 32-46.
- Ma, Z., Yoshimura, M. & Michailides, T.J. (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7145-7152.
- Ma, Z. & Michailides, T. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24: 853-863.
- McKinney, H.H. (1923). A new system of grading plant diseases. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195-218.
- Márquez, T. (2006). DuPont™ Escudo®: Fungicida preventivo para el control eficaz de las enfermedades de madera en el cultivo de la vid. *Viticultural y Enología Profesional*, 102: 53-60.
- Martín, L., Cuesta, M.J. & Martín, M.T. (2011). A new report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. hispanicum* causing grapevine trunk disease in Castilla y León, Spain. *New Disease Reports*, 23: 27.

- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. & Summerbell, R.C. (2003). *Togninia* (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*, 95: 646-659.
- Nei, M. & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269-5273.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A. & Gubler, W.D. (2005) Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease*, 89: 177-184.
- Schnabel, G. & Jones, A.L. (2001). The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil. *Phytopathology*, 91: 102–110.
- Sparapano, L., Bruno, G. & Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopatologia mediterranea*, 40 (Supplement): S376-S386.
- Sosnowski, L.R., Lardner, R., Wicks, T.J. & Scott, E.S. (2007). The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease*, 91: 924-931.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* (CABIOS), 10: 569-570.
- Yarden, O. & Katan, T. (1993). Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 83: 1478-1483.
- Zanzotto, A., Gardiman, M. & Lovat L. (2008). Effect of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium sp.* on in vitro grapevine plants. *Scientia Horticulturae*, 116: 404-408.



Discusión general



DISCUSIÓN GENERAL

Mediante prospecciones de campo realizadas en dos épocas del año y a lo largo de varios años sucesivos, se ha confirmado la presencia de plantas afectadas por los decaimientos de la vid (eutipiosis y yesca) en viñedos de seis DD.OO. de Castilla y León. Coincidiendo con lo publicado por otros autores (Redondo *et al.*, 2001; Sosnowski *et al.*, 2007; Perós *et al.*, 2008), la expresión de síntomas foliares fue muy variable entre los años estudiados. Para ambas enfermedades se cuantificaron incrementos destacados y localizados en un año y/o DD.OO. determinadas. No se observó relación entre la evolución de ambas sintomatologías.

De forma general, en Castilla y León la incidencia de eutipiosis fue superior a la incidencia de yesca. Mientras las DD.OO. con mayor incidencia de estas enfermedades fueron Cigales, Ribera del Duero, Toro y Tierra del Vino de Zamora. En todas ellas, la variedad más comúnmente empleada es Tempranillo (Tinta de Toro en la D.O. Toro). En la D.O. Rueda, donde la variedad más cultivada es Verdejo, la incidencia de eutipiosis y yesca fue menor que en las otras denominaciones de origen. Los resultados de las prospecciones de campo concuerdan con los datos obtenidos en los ensayos efectuados para comparar la susceptibilidad de distintas variedades de vid a la infección por *Pm. aleophilum* (Capítulo 4), ya que la variedad Tempranillo resultó ser más sensible que la variedad Verdejo. Sin embargo, es importante recordar que además de *Pm. aleophilum* se conocen otras muchas especies fúngicas asociadas a los decaimientos de la vid. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios de patogenicidad para confirmar esta relación.

Durante varios años de trabajo se analizaron 415 muestras de vid, a partir de las cuáles se obtuvieron 1319 entradas en la colección de hongos del ITACyL. La mayoría de ellos (1218) fueron identificados como hongos asociados a los decaimientos de la vid, mediante caracteres morfológicos a nivel de familia (Botryosphaeriaceae) o género. El análisis morfológico fue contrastado con técnicas de biología molecular para identificar a nivel de especie hasta 1096 aislados. En total se encontraron 26 especies distintas

asociadas a los decaimientos de la vid, que en la actualidad pertenecen a 14 géneros diferentes.

Coincidiendo con lo expuesto por Cobos (2008), las especies aisladas con mayor frecuencia en Castilla y León fueron *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. En esta Tesis, siete especies (*N. mediterraneum* y *N. australe*, *Pm viticola*, *Pm. hispanicum* y *Pm. mertoniae*; *C. pauciseptatum* y *Cadophora luteo-olivacea*) fueron aisladas e identificadas por primera vez en vides afectadas por los decaimientos de la vid en Castilla y León. Además se ha citado la presencia de *Pm. iranianum* asociado a síntomas de yesca en la Rioja Alavesa.

Se ha buscado una relación entre los hongos aislados y las características de las vides muestreadas (edad, sintomatología y zona de la planta). La asociación de uno o varios hongos con una sintomatología o enfermedad determinada no fue posible, aunque se obtuvieron algunos datos relevantes. Las tres especies mayoritarias fueron encontradas en todas las sintomatologías. *Phaeomoniella chlamydospora* y *Pm. aleophilum* se aislaron con una frecuencia similar en plantas jóvenes y adultas, y en todas las zonas de la planta. Entre las especies de la familia Botryosphaeriaceae *Di. seriata* fue aislado con mayor frecuencia en plantas adultas y madera de la variedad, al igual que *Di. mutila*. Pero *N. parvum* fue aislado mayoritariamente en la inserción de la raíz, el portainjerto y la zona del injerto de vides jóvenes en su mayoría sin síntomas aparentes de decaimiento. La asociación más clara fue la presencia de especies del género *Cylindrocarpon* / *Ilyonectria* en las zonas basales de plantas jóvenes con síntomas de pie negro. La descripción de esta especie como causante del pie negro ha sido citada por otros investigadores (Halleen *et al.*, 2004 y 2006; Petit & Gubler, 2005; Alaniz *et al.*, 2007).

Estos resultados coinciden parcialmente con lo publicado por otros autores (Armengol *et al.*, 2001; Dubos, 2002; Surico *et al.*, 2006; Sánchez-Torres *et al.*, 2008; Muruamendiaraz & Legorburu, 2009; Berraf-Tebbal, *et al.* 2011), y abren el debate sobre la necesidad de abordar el estudio de las comunidades fúngicas presentes en una misma planta. Tal vez convendría desviarse de afirmaciones tales como que una única especie sea el agente

causal de una enfermedad o sintomatología. Algunos estudios recientes así lo demuestran (Péros *et al.*, 2008; Casieri *et al.*, 2009).

En este trabajo, y en otras investigaciones (Aroca *et al.*, 2006) se han encontrado hongos patógenos en plantas jóvenes asintomáticas, confirmando que las nuevas plantaciones pueden ser una fuente de inóculo primario de los hongos asociados a los decaimientos de la vid en España. La presencia de estos hongos en plantas madres aparentemente sanas y viveros productores ha sido citada en todo el mundo (Fourie & Halleen, 2004; Aroca *et al.*, 2010). En la práctica, al realizar ensayos de inoculación, los hongos implicados en los decaimientos de la vid pueden ser re-aislados en tejidos sin lesiones vasculares (Feliciano *et al.*, 2004); resultados también observados en el Capítulo 4 de esta memoria.

Estos datos sugieren que los hongos pueden infectar la planta sin ocasionar una expresión inmediata de los síntomas de decaimiento en vid. Por ello, para llevar a cabo un manejo eficiente de estas enfermedades, es importante detectar las especies patógenas antes de que ocasionen pérdidas en años sucesivos. Gracias a las numerosas investigaciones realizadas, se han desarrollado varios métodos, basados en biología molecular (Tegli *et al.*, 2000b; Pollastro *et al.*, 2000; Aroca & Raposo, 2007; Alves *et al.*, 2005; Alaniz *et al.*, 2009), que permitan una identificación específica de los hongos asociados a los decaimientos de la vid.

En el Capítulo 2 de este trabajo se han empleado diferentes técnicas (AFLP, oligonucleótidos SCAR y PCR a tiempo real) para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que permitan realizar una detección rápida y altamente sensible en un gran número de muestras. Por primera vez se han diseñado oligonucleótidos específicos para *Di. seriata*, la especie más frecuente en Castilla y León. Se ha demostrado la efectividad de un sistema de PCR a tiempo real que puede detectar esporas o ADN de *Pm. aleophilum*, evitando el aislamiento previo del hongo en placa de cultivo; y que a su vez podrá utilizarse para detectar *Pa. chlamydsopora* y *Pm. aleophilum* en una única reacción (Martín *et al.*, 2012).

Una de las dificultades para el control de los decaimientos de la vid sigue siendo el elevado número de especies fúngicas asociadas. Utilizando el panel

de marcadores AFLP especie-específicos, generado en la presente investigación, será posible detectar las tres especies más abundantes (*Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*) de forma simultánea en una misma muestra.

El desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico no sería posible sin un conocimiento de la variabilidad intra-específica de cada especie. La técnica de análisis AFLP fue utilizada en este trabajo para investigar la variabilidad genética de *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*, encontrándose una variabilidad menor en *Pa. chlamydospora*. Estos resultados coinciden con lo obtenido en trabajos anteriores realizados por Tegli *et al.* (2000a), Mostert *et al.* (2006) y Cobos & Martín (2008). Según nuestros datos, es la primera vez que se aplica esta técnica para el análisis de la variabilidad genética de *Di. seriata* y *Pm. aleophilum*.

La etiología de los decaimientos de la vid, sigue siendo compleja en la actualidad, debido a la descripción de nuevas especies fúngicas relacionadas con las diferentes sintomatologías. *Phaeoacremonium* es uno de los géneros que ha experimentado más incorporaciones desde su descripción en 1996. Mediante la caracterización molecular y fenotípica de los aislados del género *Phaeoacremonium* incluidos en la colección del ITACyL, se han identificado por primer vez especies que no habían sido citadas hasta la fecha en Castilla y León (Martín & Cobos, 2007; Cobos, 2008). Coincidiendo con lo expuesto por otros autores (Armengol *et al.*, 2001; Essakhi *et al.*, 2008), *Pm. aleophilum* es la especie mayoritaria.

En este trabajo se ha llevado a cabo un amplio análisis de seis regiones de ADN, en el que han sido incluidas un total de siete especies de *Phaeoacremonium*. Los resultados obtenidos indican que la secuencia parcial de los genes de la calmodulina (exones 1 a 3) y el FE1- α (exones 2 a 3) son las más útiles en la diferenciación de las especies del género *Phaeoacremonium*. Sin duda, la información de todas las secuencias obtenidas será muy útil en futuras investigaciones y podrá emplearse por ejemplo, para el diseño de nuevos métodos de identificación especie-específicos.

La variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum* ha sido investigada en esta Tesis empleando diferentes técnicas (caracteres fenotípicos, secuenciación

múltiple de genes y marcadores moleculares de tipo RAPD y AFLP). Todas las metodologías mostraron variabilidad intra-específica en *Pm. aleophilum*. Sin embargo, utilizando la técnica AFLP se detectó una diversidad genética superior, porque proporcionó un mayor número de marcadores polimórficos y haplotipos diferentes.

El análisis conjunto de todas las secuencias detectó dos grandes grupos dentro de la población de *Pm. aleophilum* estudiada, uno más homogéneo constituido principalmente por aislados procedentes de plantas jóvenes con decaimiento y otro con mayor variabilidad, que contenía los aislados de plantas adultas con yesca y eutipiosis. Los resultados de este trabajo sugieren que ciertos genotipos pueden infectar más fácilmente las plantas jóvenes, mientras otros genotipos muestran una mayor afinidad por las plantas adultas.

Los análisis de caracterización genética basados en marcadores moleculares detectaron tres grupos consistentes en la población de *Pm. aleophilum* estudiada, segregando, no sin excepciones, los aislados de las plantas con síntomas de yesca de los aislados procedentes de plantas con eutipiosis. Estos resultados plantean una nueva cuestión aún sin resolver ¿Podría el perfil genético de *Pm. aleophilum* influir en los síntomas de decaimiento expresados por una planta enferma?

Los ensayos de patogenicidad y virulencia efectuados con aislados de los tres grupos genotípicos sobre sarmientos verdes y plantas jóvenes de vid, confirmaron la patogenicidad de *Pm. aleophilum*, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Feliciano *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Aroca & Raposo, 2009). En ensayos previos no se habían detectado diferencias en la virulencia de *Pm. aleophilum* (Laveau *et al.*, 2009), pero en este trabajo los aislados del tercer grupo genotípico fueron más virulentos. *Phaeoacremonium aleophilum* fue re-aislado con mayor frecuencia en sarmientos verdes que en plantas jóvenes, y fue capaz de inducir síntomas foliares de yesca en un bajo número de plantas inoculadas. Aunque en Castilla y León, *Pm. aleophilum* fue aislado en plantas de vid con síntomas externos de eutipiosis, en los ensayos de inoculación no se detectaron pámpanos débiles con entrenudos cortos y hojas pequeñas o cloróticas características de esta patología.

La susceptibilidad de las variedades Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura a la infección por *Pm. aleophilum* ha sido comparada en este trabajo. Al igual que en estudios previos realizados con otras variedades (Sparapano *et al.*, 2001; Feliciano *et al.*, 2004) no se detectó resistencia de ninguna de las variedades estudiadas a *Pm. aleophilum*; pero los resultados sugieren que las variedades Tempranillo y Viura son más sensibles que las variedades Garnacha y Verdejo a este patógeno.

Respecto al control de *Pm. aleophilum*, se efectuaron ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de Escudo[®] y sus dos materias activas (flusilazol y carbendazima), de inhibir el crecimiento de esta especie. Por primera vez, se encontraron aislados resistentes a estos fungicidas. La viabilidad de todos los aislados fue similar, ya que tanto los resistentes como los sensibles fueron capaces de infectar sarmientos de vid.

Se ha demostrado una baja efectividad de los DMI-triazoles (como el flusilazol) en el control de *Pm. aleophilum* y se ha descubierto que algunos aislados de esta especie son capaces de evolucionar y desarrollar resistencia a los bencimidazoles (como la carbendazima), mediante mutaciones puntuales en el codón 198 del gen de la β -tubulina. Hasta la fecha, la resistencia a las materias activas del grupo de los esterol-DMI y los bencimidazoles había sido probada en varias especies fúngicas (Albertini *et al.*, 2003; Ma & Michailides, 2005), pero nunca en hongos asociados a los decaimientos de la vid.

Con todo, los decaimientos de la vid son un conjunto de enfermedades provocadas por numerosas especies fúngicas y no existen tratamientos curativos. Estrategias preventivas como un buen manejo del viñedo o la utilización de métodos de detección en los viveros de producción, son la única alternativa para luchar de forma preventiva, contra las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades.

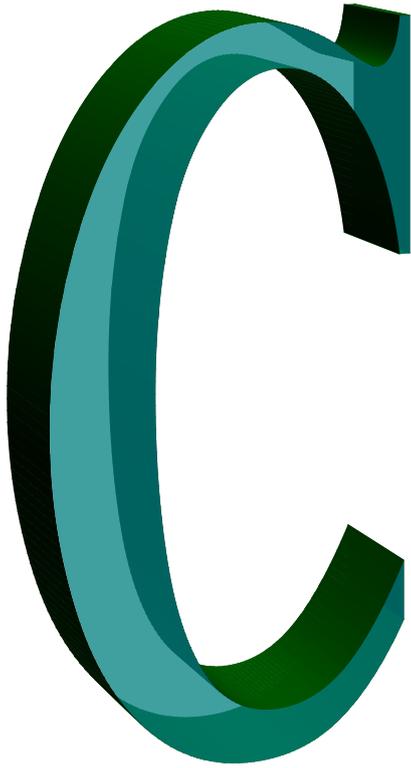
BIBLIOGRAFÍA

- Albertini, C., Gredt, M. & Leroux, P. (2003). Polymorphism of the 14 α -demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 117-128.
- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P. & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 91: 1187-1193.
- Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., & León, M. (2009). A Multiplex PCR System for the Specific Detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from Grapevine. *Plant Disease*, 93: 821-825.
- Alves, A., Phillips, A.J., Henriques, I. & Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 221-229.
- Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F. & García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): 325-329.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J. & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.
- Aroca, A. & Raposo, R. (2007). PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2911-2918.
- Aroca, A. & Raposo, R. (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* Species on Grapevines. *Journal of Phytopathology*, 157: 413-419.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 165-174.
- Berraf-Tebbal, A., Bouznad, Z., Santos, J.M., Coelho, M.A., Péros, J.P. & Phillips, A.J.L. (2011). *Phaeoacremonium* species associated with Eutypa dieback and esca of grapevines in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement): S86-S97.

- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O. & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 73-83.
- Cobos, R. (2008). Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Cobos, R. & Martín, M.T. (2008). Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines of Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.
- Dubos, B. (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. Ed. Feret. Bordeaux.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P.W., Gronewald, J.Z. & Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*, 21:119-134.
- Feliciano, A.J., Eskalen, A. & Guber, W.D. (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 66-69.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33: 313-315.
- Halleen, F., Schroers, H. J., Gronewald, J. Z. & Crous, P.W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot diseases of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, 50: 431-455.
- Halleen, F., Schroers, H.J., Gronewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H. & Crous, P.W. (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology*, 55: 227-234.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 32-46.
- Ma, Z. & Michailides, T. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24: 853-863.
- Martín, M.T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungal species associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.

- Martín, M.T., Cobos, R., Martín, L. & López-Enríquez, L. (2012). Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3985-3991.
- Mostert, L., Abln, E.C.A., Halleen, F. & Crous, P.W. (2006). Genetic diversity among isolates of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 35: 453-460.
- Muruamendiaraz, A. & Legorburu, F.J. (2009). Sutiability of an increment borer as a sampling device for grapevine trunk disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 145-149.
- Péros, J.P., Berger, G. & Jamaux-Desprésaux. (2008). Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology*, 156: 297-303.
- Petit, E. & Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89: 1051–1059.
- Pollastro, S., Abbatecola, A., Dongiovanni, C. & Faretra, F. (2000). Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in *Phellinus (Fomitiporia)* sp. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 107-111.
- Redondo, C., Tello, M.L., Ávila, A. & Mateo-Sagasta, E. (2001). Spatial distribution of symptomatic grapevines with esca disease in the Madrid region (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (Supplement): S439-S442.
- Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V. & Tuset, J.J. (2008). Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 650-660.
- Sparapano, L., Bruno, G. & Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopatologia mediterranea*, 40 (Supplement): S376-S386.
- Sosnowski, S.R., Shtienberg, D., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R., & Scott, S. (2007). The Influence of Climate on Foliar Symptoms of *Eutypa Dieback* in Grapevines. *Phytopathology – Ecology and Epidemiology* 97: 1284-1289.
- Surico, G., Mugnai, L. & Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement): S68–S86.

- Tegli, S., Santilli, E., Bertelli, E. & Surico, G. (2000a). Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 125-133.
- Tegli, S., Bertelli, E. & Surico, G. (2000b). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 134-149.



onclusiones

CONCLUSIONES

1. Evolución de los decaimientos de la vid en campo

➤ Las enfermedades que constituyen los decaimientos de la vid están presentes en Castilla y León, principalmente yesca y eutipiosis; y la expresión de los síntomas foliares muestra una importante variabilidad inter-anual.

2. Identificación y distribución de los hongos asociados a los decaimientos de la vid

➤ Se ha descubierto la presencia de nuevas especies asociadas a los decaimientos de la vid en Castilla y León: *N. mediterraneum* y *N. australe*, *Pm viticola*, *Pm. hispanicum* y *Pm. mertoniae*; *C. pauciseptatum* y *Cadophora luteo-olivacea*.

➤ Las tres especies aisladas con mayor frecuencia en plantas afectadas por los decaimientos de la vid son: *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*; y no fue posible confirmar la asociación de uno o varios hongos patógenos con una sintomatología determinada.

➤ *Di. seriata* fue aislado con mayor frecuencia en plantas adultas y madera de la variedad, al igual que *Di. mutila*. En planta joven fue frecuente el aislamiento de *N. parvum* en el portainjerto y la zona del injerto; y de *Cylindrocarpon* spp. en la raíz. *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum* fueron aislados con una frecuencia similar en plantas jóvenes y adultas y en todas las zonas de la planta.

3. Variabilidad genética de *Di. seriata*, *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*

➤ Mediante la técnica AFLP se detectó una variabilidad genética mayor en *Di. seriata* y *Pm. aleophilum* que en *Pa. chlamydospora*.

4. Desarrollo de nuevos sistemas de detección

➤ Se ha desarrollado un panel de marcadores monomórficos de tipo AFLP que permite una detección simultánea de las tres especies mayoritarias

utilizando las combinaciones de oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CG y *EcoRI*-AA/*MseI*-CA.

➤ La búsqueda de marcadores RAPD específicos de *Di. seriata* permitió el diseño de los oligonucleótidos SCAR: DS3.8 S3, DS3.8 R4 y DS3.8 R6; y se desarrolló una PCR sensible, para la detección rápida y rutinaria de la especie mayoritaria en Castilla y León.

➤ Se diseñó un sistema eficiente de PCR a tiempo real capaz de detectar ADN de *Pm. aleophilum* extraído directamente de madera de vid, con mayor sensibilidad que otras metodologías; y adaptable a la detección de *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora* en una única reacción.

➤ Los métodos de detección desarrollados en este trabajo ofrecen grandes expectativas para el control de los decaimientos de la vid, porque pueden aplicarse a un gran número de muestras para diagnosticar de forma rápida y altamente sensible la presencia de los hongos responsables.

5. Caracterización fenotípica y molecular de *Phaeoacremonium* spp. y estudio de la variabilidad intra-específica de *Pm. aleophilum*

➤ La caracterización fenotípica y la secuenciación de seis fragmentos de ADN permitió identificar las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. viticola*, *Pm. iranianum*, *Pm. mortoniae* y *Pm. hispanicum* a partir de una colección de 175 aislados de *Phaeoacremonium* spp., procedentes de plantas de vid; *Pm. aleophilum* fue la especie mayoritaria.

➤ La secuenciación parcial de los genes de la calmodulina (exones 1 a 3) y el FE1- α (exones 2 a 3) fueron las más útiles en la diferenciación de las especies del género *Phaeoacremonium*.

➤ En base a la caracterización fenotípica y la secuenciación parcial de genes se determinó que existe una importante variabilidad intra-específica entre los aislados de *Pm. aleophilum*.

➤ La caracterización molecular realizada con la técnica RAPD discriminó las especies *Pm. aleophilum*, *Pm. viticola*, *Pm. scolyti* y *Pm. parasiticum* y detectó tres grupos consistentes entre los aislados de *Pm. aleophilum*, coincidiendo con la caracterización molecular efectuada mediante AFLP.

➤ Los resultados obtenidos sugieren que la variabilidad genética de *Pm. aleophilum* puede estar relacionada con la edad y la sintomatología de las plantas de *Vitis vinifera*, ya que, en general, los genotipos del primer grupo fueron encontrados en plantas jóvenes con síntomas de la enfermedad de Petri, los del segundo grupo en plantas adultas con síntomas de yesca y los del tercer grupo en plantas adultas con síntomas de eutipiosis.

6. Relación de la variabilidad genética de *Pm. aleophilum* con su patogenicidad y virulencia

➤ La inoculación de sarmientos y plantas jóvenes de vid con diferentes *Pm. aleophilum* demostró la patogenicidad de esta especie y reveló diferentes grados de virulencia, resultando los monospóricos del tercer grupo genotípico los más virulentos.

7. Susceptibilidad de las variedades de vid Tempranillo, Verdejo, Garnacha y Viura a la infección por *Pm. aleophilum*

➤ Las cuatro variedades de *Vitis vinifera* estudiadas y empleadas en Castilla y León, fueron susceptibles a la infección por *Pm. aleophilum*, aunque Tempranillo y Viura fueron más sensibles que Garnacha y Verdejo.

8. Resistencia de *Pm. aleophilum* a fungicidas

➤ Por primera vez se han encontrado aislados de *Pm. aleophilum* resistentes a Escudo[®], carbendazima y flusilazol; siendo carbendazima la materia activa responsable de la acción fungicida del producto comercial Escudo[®].

➤ Los ensayos de inoculación en sarmientos han demostrado que los monospóricos resistentes a fungicidas no tienen una capacidad patogénica menor que los sensibles.

➤ No se encontraron marcadores AFLP asociados con la resistencia de *Pm. aleophilum* a fungicidas, pero algunos de los monospóricos resistentes a carbendazima mostraron dos mutaciones distintas en el codón 198 del gen de la β -tubulina.

