

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO DE *Phaeomoniella* *chlamydospora* EN CAMPO

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: SERGIO ARIZMENDI PABLOS

TUTOR: JOSEP ARMENGOL FORTÍ
COTUTORES: MÓNICA BERBEGAL MARTÍNEZ
SANTIAGO CATALÁ GARCÍA

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, Julio de 2015

Tipo Licencia



Datos personales

Nombre y apellidos: Sergio Arizmendi Pablos

Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFG: Desarrollo de un protocolo de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación del inóculo de *Phaeomoniella chlamydospora* en campo.

Lugar de realización: Unidad de Patología Vegetal, Dpto. Ecosistemas Agroforestales

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor y Cotutores: Josep Armengol Fortí, Mónica Berbegal Martínez, Santiago Catalá García

Valencia, julio de 2015

Resumen

Phaeomoniella chlamydospora es uno de los principales hongos fitopatógenos implicados en las enfermedades fúngicas de madera de la vid (EFMV), que causan importantes pérdidas en el sector vitícola. Para el control de las EFMV es necesario minimizar el riesgo de infección a través de heridas de poda desde el momento de la plantación en el viñedo. En este sentido, conocer la disponibilidad de inóculo en campo es imprescindible para la toma de decisiones relacionadas con el manejo de estas enfermedades.

Uno de los métodos utilizados para el seguimiento en campo del inóculo aéreo de hongos fitopatógenos es el sistema Burkard, que toma muestras de partículas en el aire por impacto en una cinta adhesiva, para su posterior cuantificación por observación de esporas en microscopio. Dada la complejidad de este proceso, las técnicas moleculares pueden suponer una alternativa eficaz para detectar e incluso cuantificar hongos en muestras ambientales.

El objetivo de este trabajo es poner a punto un protocolo de extracción, detección y cuantificación de *Pa. chlamydospora* mediante PCR a tiempo real. Para ello, se utilizaron muestras de concentraciones conocidas de conidios obtenidos *in vitro*, así como muestras procedentes de campo.

En primer lugar, se preparó una solución madre con alta concentración de conidios (5×10^7 conidios/ml) procedente de *Pa. chlamydospora* cultivado *in vitro* y se realizaron diluciones seriadas 1:10 y 1:5. Sobre cintas impregnadas con silicona, reproduciendo el sistema Burkard, se aplicó una cantidad determinada de cada dilución y se procedió a la extracción de ADN.

Para la detección fue necesario el uso de una PCR anidada. En la primera reacción se amplificó una región de ADNr contenida entre los genes 18S y el Espaciador Interno Transcrito 2 (ITS2) con la combinación de un cebador universal y uno específico de *Pa. chlamydospora*. Los productos de PCR se utilizaron como molde en la PCR a tiempo real usando cebadores específicos de *Pa. chlamydospora*.

Para la aplicación del protocolo puesto a punto se expusieron dos portaobjetos con cintas siliconadas en dos viñedos localizados en Onteniente y Albacete. Además, se recopilieron los datos meteorológicos de zonas próximas a las parcelas estudiadas durante el periodo de muestreo.

El protocolo desarrollado resultó altamente específico y sensible, consiguiéndose alcanzar un límite de detección de 52 conidios de *Pa. chlamydospora* por cm^2 de cinta. En las muestras procedentes de campo se obtuvieron 7 positivos de *Pa. chlamydospora* en Onteniente y 2 en

Albacete. El mayor número de positivos detectados en la parcela de Onteniente podría asociarse a que se trata de un viñedo más antiguo y sin los controles fitosanitarios de la parcela de Albacete. Las muestras positivas se relacionaron con las condiciones ambientales registradas en las parcelas.

El uso de técnicas moleculares resulta una alternativa a la detección y cuantificación por microscopía de conidios, y su combinación con sistemas de captura de partículas aéreas podría dar lugar al desarrollo de métodos de predicción de las EFMV con un margen de tiempo adecuado para el empleo eficiente de las medidas de control existentes.

Palabras clave

Phaeomoniella chlamydospora, enfermedades fúngicas de madera de la vid, PCR a tiempo real, cuantificación de conidios

Abstract

Phaeomoniella chlamydospora is one of the main fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases (GTD), which cause significant economic losses to the wine industry worldwide. For GTD management it is necessary to minimize infection risk through pruning wounds since the time of planting. Thereby, knowledge of pathogen inoculum dynamics in field and its relationship with the environmental conditions is essential to support decision-making in GTD management.

One of the methods used for monitoring the airborne inoculum of plant pathogenic fungi in field is the Burkard system, which takes samples of the airborne particles impacting on a tape for the subsequent quantification of spores by observation under microscope. This process is complex, so that molecular techniques can represent an effective alternative to detect and quantify fungi in environmental samples.

The objective of this research is the development of *Pa. chlamydospora* extraction, detection and quantification protocol using real-time PCR. To this aim, samples with known concentrations of conidia obtained *in vitro* and from field samples were used.

At first, a stock solution with high concentration of conidia was prepared (5×10^7 conidia/ml) from *Pa. chlamydospora* grown *in vitro* and serial dilutions 1:10 and 1:5 were made. Known quantities of each dilution were applied on tapes reproducing the Burkard system and DNA extraction was made.

A nested PCR was needed for low concentrations of DNA detection. In the first round of PCR reaction, a rDNA region included between 18S and the Internal Transcribed Spacers 2 (ITS2) genes was amplified with a combination of a universal primer and a specific primer of *Pa. chlamydospora*. Resulting products were used as DNA template in second round real-time PCR using specific primers for *Pa. chlamydospora*.

Two slides with tapes were exposed in two vineyards located in Onteniente and Albacete for the application of the protocol. Moreover, meteorological data were obtained in areas close to the vineyards during the sampling period.

The established protocol was probed to be specific and sensitive, and the limit of detection was 52 conidia of *Pa. chlamysopora* per cm^2 of tape. Seven and 2 positives samples of *Pa. chlamydospora* were obtained in Onteniente and Albacete, respectively. These results can be associated to Onteniente vineyard conditions, older than the one located in Albacete and not under phytosanitary control measures. A relationship between the environmental conditions registered and the positive samples was observed.

The use of molecular techniques is an alternative of the conidia microscopic detection and quantification and its combination with spore samplers could help to develop GTD prediction methods and optimize disease management.

Key word

Phaeomoniella chlamydospora, grapevine trunk diseases, real time PCR, conidia quantification

Agradecimientos

A Josep Armengol, que me abrió las puertas de este laboratorio, ayudándome a aprender y a disfrutar con lo que hacía. A Mónica, fundamental en cada momento, que me ha dedicado el doble de su tiempo cuando ni siquiera lo tenía para sí misma. Y, por supuesto, a Santi, por todo y mucho más.

Gracias a todo el equipo del laboratorio por haberme hecho sentir uno más durante todo este tiempo, resolverme dudas y poner todos los recursos que he necesitado a mi alcance. Especialmente a Toni, un compañero y un amigo con el que siempre he podido contar.

Finalmente, gracias a mi familia. A mi hermano, mi padre y, sobre todo, a mi madre, porque su confianza en mí nunca me ha hecho desfallecer.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del cultivo de la vid en España	1
1.2. Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid	2
1.3. Dispersión de las enfermedades fúngicas de la madera e infección de las plantas	4
1.3.1. Fuentes de inóculo	4
1.3.2. Vías de dispersión.....	5
1.3.3. Vías de infección.....	6
1.3.4. El ciclo de la enfermedad causada por <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	6
1.4. Técnicas moleculares para la detección de EFMV	8
2. OBJETIVOS	11
3. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO DE <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> EN CAMPO	12
3.1. Materiales y métodos	12
3.1.1. Preparación de suspensiones de conidios, extracción de ADN y preparación de diluciones de ADN	12
3.1.2. Ajuste del protocolo de detección y cuantificación de conidios de <i>Pa. chlamydospora</i>	13
3.1.3. Validación del protocolo.....	19
3.1.4. Validación del protocolo en muestras de campo	19
3.2. Resultados y discusión	21
3.2.1. Ajuste del protocolo	21
3.2.2. Obtención de la recta de calibrado y validación del protocolo.....	23
3.2.3. Validación del protocolo en muestras de campo	26
3.3. Conclusiones	31
4. BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de conidios (conidios/ml y conidios/cm ²) de las diluciones seriadas 1:10 (D1, D2, D3, D4 y D5) e intermedias 1:5 (D3,8 y D4,8).....	14
Tabla 2. Concentración y volumen de los componentes de la mezcla de reacción de PCR y qPCR.	15
Tabla 3. Condiciones de reacción para PCR y qPCR.	16
Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) de ADN ribosómico (ADNr).	17
Tabla 5. Concentración de conidios en la suspensión (conidios/ml), conidios en la superficie de la cinta (conidios/cm ² de cinta) y ADN (ng/μl) de las muestras de validación.....	19
Tabla 6. Valores promedio de Ct para las diluciones (Tabla 1) y validaciones (Tabla 5) amplificadas con los cebadores Pch1 y Pch2.	25
Tabla 7. Concentración de conidios (conidios/cm ²) cuantificada en los portaobjetos A y B de las parcelas de Onteniente y Albacete las semanas en que se obtuvieron positivos para <i>Pa. chlamydospora</i>	27

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolución de la superficie de viñedo plantada en España (por hectárea) desde la campaña 2008/2009 hasta 2012/2013 (MAGRAMA, 2015). 1
- Figura 2.** Sintomatología de las EFMV en planta adulta. (a) Seca de brazos y agostamiento prematuro en una planta afectada por Yesca. (b) Detalle de podredumbre esponjosa de la madera en una planta afectada por Yesca. (c) Brazo con brotaciones raquílicas en una planta afectada por Eutipiosis. (d) Detalle de necrosis sectoriales de madera en una planta afectada por “*Botryosphaeria dieback*” 2
- Figura 3.** Ciclo de la enfermedad causada por *Pa. chlamydospora* (Gramaje y Larignon, 2015). 7
- Figura 4.** (a) Conidióforos y conidios de *Pa. chlamydospora*. (b) Conidióforos y conidios del sinanamorfo tipo *Phoma* (Crous y Gams, 2000). 8
- Figura 5.** Tipos de sistema de muestreo de partículas aéreas. (a) Capturador Burkard. (b) Sistema de brazo rotatorio. (c) Sistema de muestreo en fase líquida. (d) Variante del Sistema Burkard. (e) Sistema Andersen (West et al., 2008). 9
- Figura 6.** Esquema de los pasos seguidos en el ajuste del protocolo de detección y cuantificación de conidios de *Pa. chlamydospora*. Cada uno de los pasos mostrados en los recuadros se desarrolló mediante una PCR cuantitativa en la que se emplearon los cebadores que se emplearon los cebadores que aparecen en color rojo. 14
- Figura 7.** Localización de cada uno de los cebadores en el ADN ribosómico de *Pa. chlamydospora* (Gardes y Bruns, 1993; Korabecna, 2007; Edwards et al., 2007). 17
- Figura 8.** (a) Trampa de conidios diseñada. (b) Detalle de gotas de lluvia dispuestas en la superficie de la trampa de conidios. (c) Parcela de Onteniente donde se pueden distinguir vides sintomáticas de EFMV. 21

Figura 9. Curvas de amplificación, donde se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia emitida. Diluciones por duplicado (Tabla 1) amplificadas con la pareja de cebadores Pch1 y Pch2.....	22
Figura 10. Curvas de amplificación, donde se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia emitida. Diluciones por duplicado (Tabla 1) amplificadas con: (A) pareja de cebadores ITS1-F y Pch2 y (B) pareja de cebadores Pch1 e ITS4.	24
Figura 11. Recta de calibrado ajustada con las diluciones D2; D3; D3,8; D4 y D4,8 (Tabla 2), donde se representa la concentración de ADN frente al valor de Ct de cada una de las diluciones.	24
Figura 12. Productos de PCR anidada correspondientes a muestras aéreas de campo positivas para conidios de <i>Pa. chlamydospora</i> . M: 3 µl de marcador GeneRuler 100 pb Plus; 1-9: positivos obtenidos en los portaobjetos A (Tabla 7); (+): control positivo de ADN puro; (-): control negativo.	26
Figura 13. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm ² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos A de Onteniente.	28
Figura 14. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm ² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos B de Onteniente.	28
Figura 15. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm ² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos A de Albacete.	29

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

E. lata: *Eutypa lata*

Pa. chlamydospora: *Phaeomoniella chlamydospora*

Pm. aleophilum: *Phaeoacremonium aleophilum*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

Ct: "Cycle threshold"

EFMV: Enfermedades Fúngicas de la Madera de la Vid

HR: Humedad Relativa

HTS: "High Throughput Sequencing"

ITS: Espaciadores Transcritos Internos

LD: Límite de Detección

NGS: "Next Generation Sequencing"

PDA: Patata Dextrosa Agar

PRC: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real

μl: microlitro

μM: micromolar

conidios/cm² de cinta: conidios por centímetro cuadrado de cinta

conidios/ml: conidios por mililitro

etc.: etcétera

fg: femtogramos

h: hora

ha: hectáreas

Hz: hertzios

km: kilómetros

mA: miliamperios

min: minutos

ml: mililitro

mm/h: milímetros por hora

mm: milímetros

ng/μl: nanogramos por microlitro

°C: grados Celsius

pb: pares de bases

pg/μl: picogramos por microlitro

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

V: voltios

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del cultivo de la vid en España

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los principales cultivos en España, con una superficie plantada de 957.573 ha y un potencial vitícola de 1.045.427 ha, que incluye: la superficie actualmente plantada de viñedo, los derechos de plantación de viñedo que se encuentran en poder de los agricultores sin utilizar y los derechos de las reservas regionales (MAGRAMA, 2015).

Aunque bien es cierto que la evolución de esta superficie ha sido descendente en los últimos años (Figura 1), el valor de la producción de la vid comprende el 8 % de la producción vegetal en España, lo que se traduce en un total de 18 millones de jornales y 2.142,8 millones de euros asociados al sector vitivinícola (MAGRAMA, 2015).

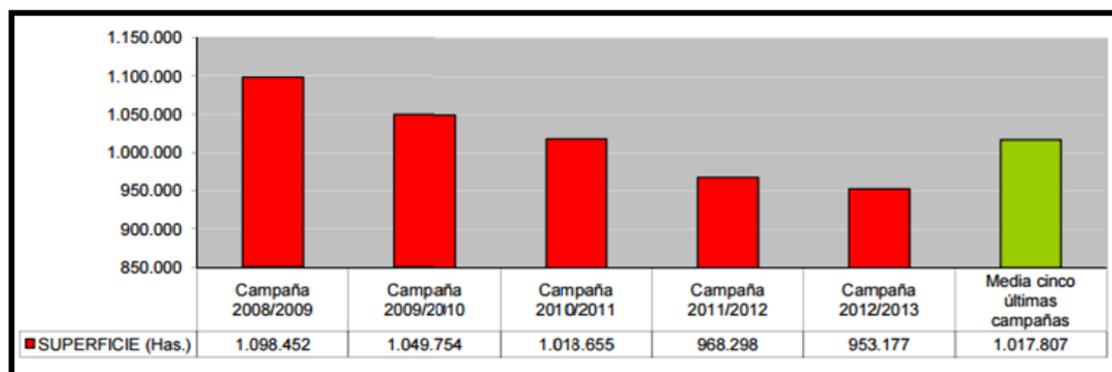


Figura 1, Evolución de la superficie de viñedo plantada en España (por hectárea) desde la campaña 2008/2009 hasta 2012/2013 (MAGRAMA, 2015).

Las amenazas a las que están expuestos los viñedos comerciales engloban hasta 20 tipos de plagas potenciales, diversas enfermedades y malas hierbas (MAGRAMA, 2014). De entre ellas, en la actualidad, las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) son uno de los problemas más graves del cultivo (Luque *et al.*, 2014a). Por tanto, dado el impacto del cultivo tanto en el sector agrícola como en el ámbito económico de España, el sector vitivinícola demanda alternativas para controlar su expansión y, de esta manera, aumentar la vida productiva de los viñedos implantados.

Con este objetivo, el establecimiento de medidas de prevención y/o culturales para las EFMV ha sido objeto de múltiples ensayos experimentales y un campo de investigación en constante desarrollo.

1.2. Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid

Las enfermedades fúngicas de la madera de la vid engloban toda una serie de patologías que causan necrosis y/o podredumbres internas de la madera, empobreciendo el vigor del producto y reduciendo la cantidad y calidad de la cosecha (Waite y May, 2005).

Estas enfermedades están causadas por una serie de hongos fitopatógenos que pueden causar infecciones conjuntas en las plantas y cuya sintomatología es diversa (Figura 2). En España, las EFMV más importantes en plantas adultas son: Yesca, Eutipiosis y decaimiento por *Botryosphaeria* o “*Botryosphaeria dieback*” (MAGRAMA, 2014).

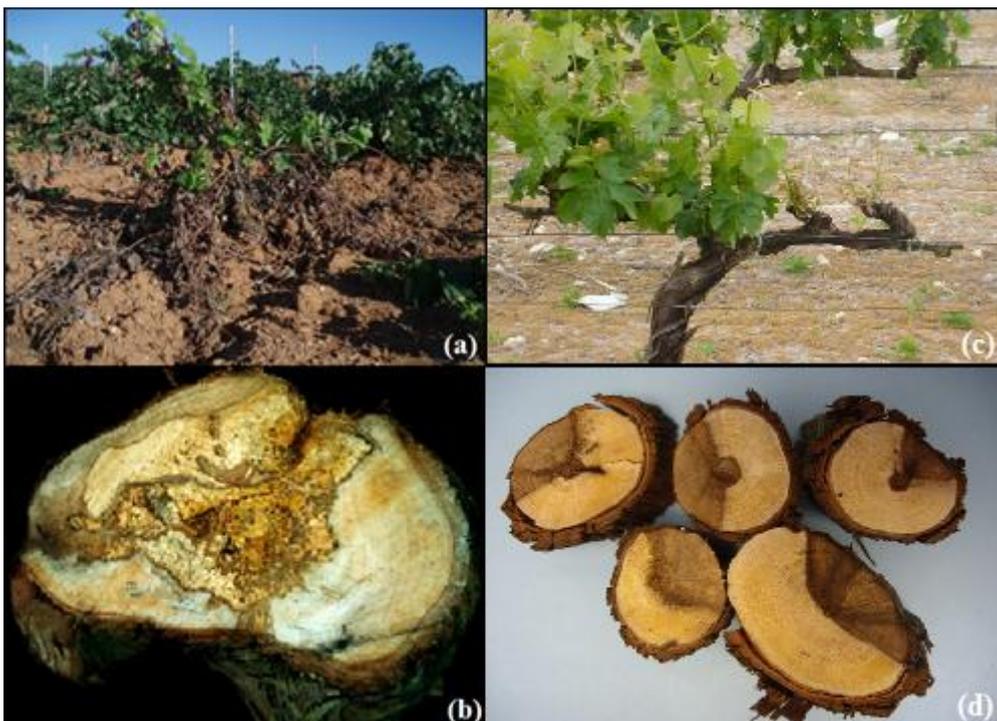


Figura 2. Sintomatología de las EFMV en planta adulta. (a) Seca de brazos y agostamiento prematuro en una planta afectada por Yesca. (b) Detalle de podredumbre esponjosa de la madera en una planta afectada por Yesca. (c) Brazo con brotaciones raquílicas en una planta afectada por Eutipiosis. (d) Detalle de necrosis sectoriales de madera en una planta afectada por “*Botryosphaeria dieback*”.

Yesca. Enfermedad causada principalmente por el hongo basidiomiceto *Fomitiporia mediterranea* que provoca una podredumbre seca y esponjosa de la madera en las zonas centrales del tronco y/o brazos (Figura 2a y b), la cual aparece separada por una línea negra de otra zona más exterior, de consistencia dura, en la que se aprecian puntos o estrías necróticas en los que, además, se pueden encontrar los hongos *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeoconiella chlamydospora*. Externamente, la yesca se puede presentar bajo dos formas: lenta y rápida o apopléjica. En la primera, las hojas muestran en las zonas internerviales coloraciones amarillentas en las variedades de uva blanca y rojizas en las tintas, que posteriormente evolucionan a necrosis. Los racimos pueden llegar a pasificarse prematuramente. Estos síntomas pueden manifestarse de forma crónica en algunas plantas y de forma totalmente errática en otras, mostrándolos un año pero no al siguiente. En la forma apopléjica se produce la muerte repentina de la planta, generalmente en los meses de verano (MAGRAMA, 2014).

Eutipiosis. Esta enfermedad está provocada principalmente por *Eutypa lata*, un hongo que presenta más de 80 especies hospedantes y puede afectar a plantas de menos de 10 años (Bertsch *et al.*, 2012). Las plantas que sufren eutipiosis desarrollan brotes raquíuticos con entrenudos cortos y hojas pequeñas y cloróticas con necrosis marginal y tejido internervial muerto (Figura 2c), lo cual puede suponer la muerte de la planta por carencias fotosintéticas (Bertsch *et al.*, 2012).

Decaimiento por Botryosphaeria. Los hongos responsables de esta enfermedad pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae, siendo algunas de las especies más importantes afectando a vid en España *Diplodia seriata* o *Neofusicoccum parvum* (MAGRAMA, 2014). Los síntomas de la enfermedad son similares a los de eutipiosis: las yemas no brotan en primavera o dan lugar a pámpanos muy débiles. Además, se observan necrosis sectoriales y de consistencia dura en la madera que, en sus primeras fases, afectan a uno solo de los brazos de la planta (Figura 2d), causando su desecación y muerte (MAGRAMA, 2014).

Diversos estudios han conseguido aislar la mayoría de estos patógenos en muestras de madera (Martín *et al.*, 2012; Van Niekerk *et al.*, 2011), pero no han podido aislarse en muestras de hoja o frutos (Bertsch *et al.*, 2012). Esto indica que los hongos no alcanzan estos tejidos, sino que segregan toxinas capaces de distribuirse por toda la planta y alterar el metabolismo primario, desencadenando reacciones de defensa por parte de la vid, tales como la gomosis o la síntesis de proteínas fungicidas, en detrimento del crecimiento y la fructificación (Bertsch *et al.*, 2012).

En las últimas dos décadas la incidencia de las EFMV se ha incrementado en todas las regiones vitivinícolas del mundo, principalmente a raíz de la prohibición del fungicida más efectivo hasta la fecha, el arsenito de sodio (Bertsch *et al.*, 2012). Además, factores como el estrés biótico y abiótico presente en los viveros, la inadecuada gestión de los viñedos y la falta de estrategias eficaces sobre la enfermedad han empeorado ostensiblemente la situación (Gramaje y Armengol, 2011). Esto ha supuesto un mayor interés en la búsqueda de métodos de detección, identificación y manejo sostenible de los patógenos causantes de las EFMV que sean eficaces y aplicables en las parcelas comerciales.

1.3. Dispersión de las enfermedades fúngicas de la madera e infección de las plantas

Los patógenos asociados a las EFMV pueden entrar en contacto con las plantas de vid en diferentes momentos, desde el proceso viverístico hasta el campo (Gramaje y Armengol, 2011). Una vez en campo, y cuando las condiciones climáticas son favorables, las enfermedades pueden manifestarse en etapas tempranas o permanecer en estado de latencia para manifestarse más tarde (Luque *et al.*, 2014a), con lo cual, el inóculo de estas enfermedades está presente a lo largo de toda la vida de la vid.

Algunos de los hongos citados en el apartado anterior se caracterizan por ser habitantes comunes del suelo (Luque *et al.*, 2014a) y otros pueden diseminarse por salpicaduras de lluvia, corrientes de aire, artrópodos y/o tijeras de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2015), dándose preferentemente la infección cuando las esporas fúngicas (sexuales y/o asexuales) penetran a través de las heridas de poda durante el período de latencia (Agustí-Brisach *et al.*, 2015).

1.3.1. Fuentes de inóculo

El inóculo de los hongos de la madera de la vid está presente en las plantas que han desarrollado la enfermedad y muestran partes sintomáticas que deben ser eliminadas durante la poda (Luque *et al.*, 2014a). A menudo estos restos de poda infectados son abandonados en las proximidades del viñedo y es entonces cuando se genera la principal fuente de inóculo de estos hongos, ya que sobre los restos vegetales la esporulación de los patógenos, como *E. lata*

y varias especies de Botryosphaeriaceae (Gramaje y Armengol, 2011), se mantiene durante años, lo que contribuye a aumentar el riesgo de infección (Luque *et al.*, 2014a).

1.3.2. Vías de dispersión

Gotas de agua. Los hongos de la madera de la vid como *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., *E. lata* y varias especies de Botryosphaeriaceae son capaces de infectar heridas de poda a partir de su diseminación después de los eventos de lluvia o tras largos periodos de alta humedad relativa (Niekerk *et al.*, 2010), especialmente si éstos tienen lugar desde finales de otoño hasta principios de primavera (Úrbez-Torres *et al.*, 2010). La intensidad de las precipitaciones y el diámetro de las gotas de agua son parámetros a tener en cuenta en la dispersión, ya que las gotas de mayor tamaño pueden contener más cantidad de conidios procedentes de los hongos de la madera de la vid y, además, el impacto contra el suelo supone su división en múltiples gotas que incrementan la dispersión (Ahimera *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de estudios se han centrado en la detección de conidios de los patógenos responsables de las EFMV en agua de lluvia, al agua de riego se le podrían aplicar los mismos efectos y la misma importancia en la dispersión de las enfermedades fúngicas (Úrbez-Torres *et al.*, 2010).

Viento. El viento es una vía de dispersión esencial en la diseminación de los propágulos de *E. lata*, los cuales pueden llegar a recorrer distancias de hasta 100 km siendo transportados por las corrientes de aire (Úrbez-Torres *et al.*, 2010). También se asocia a la diseminación de Botryosphaeriaceae spp., aunque en menor medida (Úrbez-Torres *et al.*, 2010).

Insectos. Los insectos (principalmente artrópodos) y, en menor medida, las aves, son otros agentes naturales de dispersión de las enfermedades de la madera de la vid, sobre todo relacionados con Botryosphaeriaceae spp. (Ahimera *et al.*, 2004).

Tijeras de poda. El uso inadecuado de tijeras de poda sin desinfectar tiene una repercusión importante en la transferencia de los propágulos de hongos de la madera de la vid procedentes de vides infectadas hacia material vegetal sano (Agustí-Brisach *et al.*, 2015). En los ensayos realizados por Agustí-Brisach *et al.* (2015) se confirmó la presencia de *Pm. aleophilum*,

Botryosphaeriaceae spp. y *Pa. chlamydospora* en tijeras de poda utilizadas en viñedos comerciales, así como la susceptibilidad de las heridas de poda a ser infectadas por esta vía de dispersión.

1.3.3. Vías de infección

La principal vía de infección de los patógenos causantes de las EFMV son las heridas de poda (van Niekerk *et al.*, 2011), especialmente cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (Luque *et al.*, 2014b). La severidad de la infección depende del inóculo del patógeno y del estado sanitario del viñedo, pero el factor fundamental en la susceptibilidad de la planta es el momento de la poda (Luque *et al.*, 2014b).

En España, el momento óptimo para la poda ha sido tradicionalmente a finales de invierno (Luque *et al.*, 2014b), ya que se considera que realizar la poda a finales de otoño o principios de invierno incrementa la susceptibilidad a los patógenos de la madera (Agustí-Brisach *et al.*, 2015). Sin embargo, según los estudios de Luque *et al.* (2014b) realizados en la comarca del Penedés, la tasa de infección de las heridas de poda por los patógenos de la madera de la vid fue menor cuando se realizó la poda en otoño que a finales de invierno. Por este motivo, es difícil establecer una pauta definida en el control de las EFMV asociada a la poda, a menos que se evalúen las condiciones específicas para cada región.

El periodo de susceptibilidad de las heridas de poda a estos hongos dura de 2 a 3 meses en función de las condiciones meteorológicas, la época del año y, probablemente, del propio viñedo (variedad, edad, riego, etc.) (Luque *et al.*, 2014a). Sin embargo, la susceptibilidad de las heridas tiende a desaparecer a medida que la planta madura (Luque *et al.*, 2014b).

1.3.4. El ciclo de la enfermedad causada por *Phaeoconiella chlamydospora*

Este trabajo se centra en la detección de conidios de *Pa. chlamydospora* mediante técnicas moleculares, con lo cual es imprescindible conocer el ciclo de la enfermedad (Figura 3), ya que va a justificar parte del proceso experimental diseñado y alguna de las decisiones tomadas durante la realización de este trabajo.

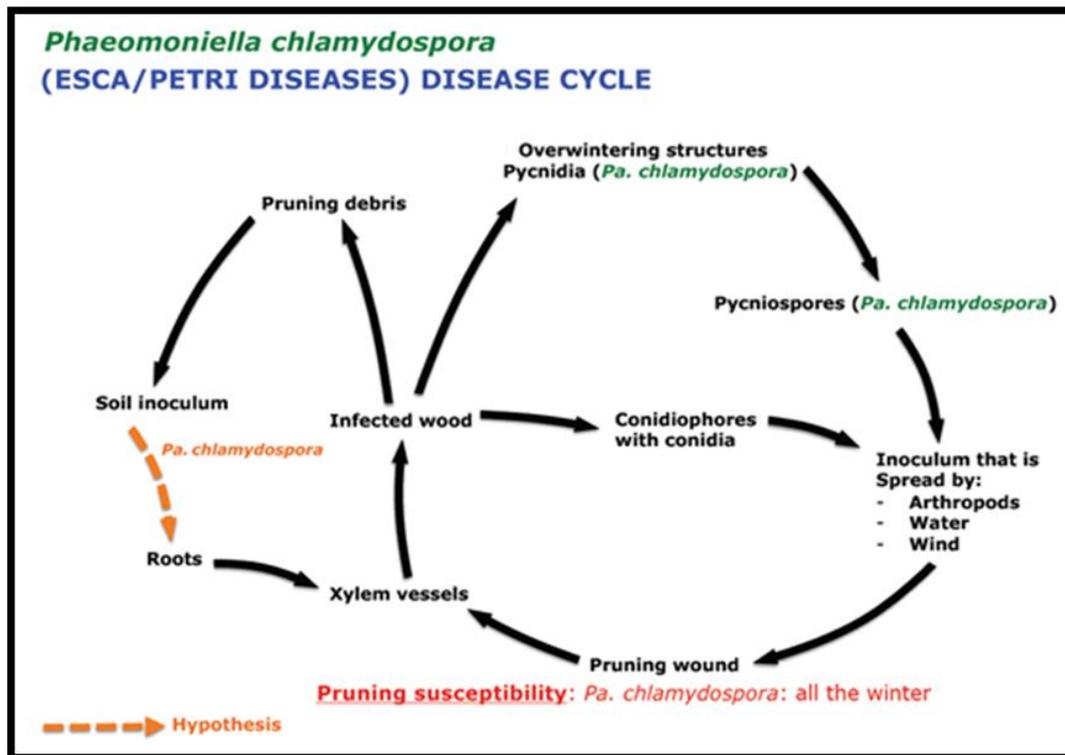


Figura 3. Ciclo de la enfermedad causada por *Pa. chlamydospora* (Gramaje y Larignon, 2015).

La principal fuente de inóculo de *Pa. chlamydospora* se encuentra en los restos de poda infectados, donde el hongo genera conidios a partir de células conidiógenas o conidióforos libres en el micelio (Figura 4a), o dentro de picnidios (Figura 4b). Las grietas y hendiduras profundas en el interior de la madera suponen un entorno ideal para el desarrollo de conidios, ya que proporcionan un ambiente húmedo y protegido.

Según el trabajo desarrollado por Larignon y Dubos (2000), la dispersión de los conidios de este hongo tiene lugar durante todo el año y se ve potenciada por los factores explicados en el apartado 3.2.

Los conidios penetran la madera de la vid aprovechando las heridas de poda, cuya susceptibilidad a la infección puede durar hasta 4 meses (van Niekerk *et al.*, 2011). Por otra parte, también se ha considerado la posibilidad de que los conidios de *Pa. chlamydospora* penetren en el material vegetal a través de las raíces de la vid (Gramaje y Armengol, 2011).

Una vez en la planta, el patógeno inicia la infección propagándose a lo largo del xilema hacia diferentes órganos vegetales.

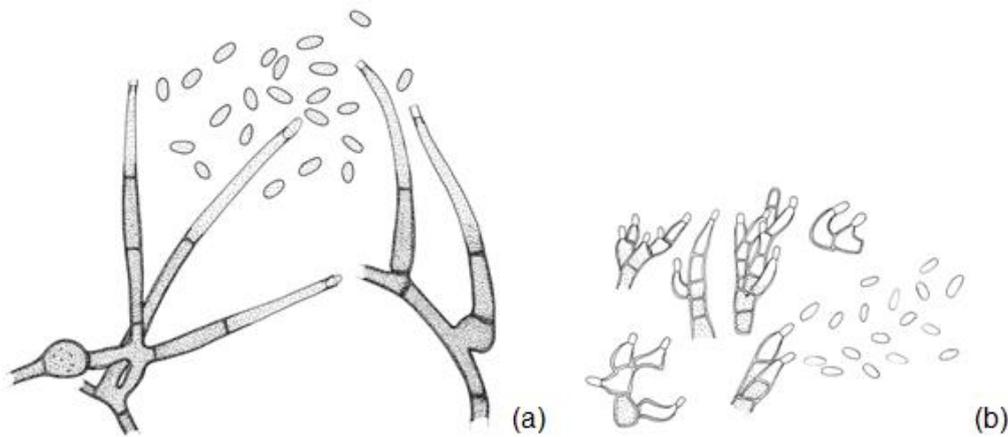


Figura 4. (a) Conidióforos y conidios de *Pa. chlamydospora*. (b) Conidióforos y conidios del sinanamorfo tipo *Phoma* (Crous y Gams, 2000).

1.4. Técnicas moleculares para la detección de EFMV

La necesidad de detectar e identificar los patógenos causantes de las EFMV ha supuesto un extenso desarrollo de herramientas moleculares dedicadas a este fin. El método tradicional de aislamiento a partir de material vegetal afectado se basa en el uso de medios de cultivo específicos, donde se cultivan fragmentos de las muestras objeto de diagnóstico con el fin de determinar si hay crecimiento, es decir, si está presente el hongo u hongos de interés. Sin embargo, este método se caracteriza por su lentitud y sus limitaciones operacionales, debido a varios motivos: el hongo debe de crecer en el medio durante días o semanas, puede que no todos los hongos en la muestra queden representados en el proceso o que las distintas especies presentes crezcan a ritmos diferentes (Gramaje y Armengol, 2011).

Las técnicas moleculares tienen gran interés si se aplican a estudios epidemiológicos. En este sentido, el principal objetivo ha sido el diseño de cebadores específicos para la especie patógena objeto de estudio, que permitan la detección y cuantificación de los mismos a partir de una muestra ambiental. En el contexto de las EFMV se han conseguido resultados satisfactorios, logrando identificar, por ejemplo, especies de Botryosphaeriaceae a partir de muestras de tejidos vegetales, agua y suelo de los viñedos (Gramaje y Armengol, 2011). Los protocolos desarrollados también pueden aplicarse a la detección y cuantificación de propágulos en el aire, mediante los diversos sistemas de muestreo de partículas aéreas existentes (Figura 5), de los cuales, el sistema Burkard (Burkard Manufacturing Company Ltd) es el más usado para estudios epidemiológicos (Jacksonab y Bayliss, 2011). El captador

Burkard tiene la capacidad de atrapar las partículas aéreas por impacto en una cinta adhesiva que se mueve a una velocidad de 2 mm/h, para proporcionar un registro continuo de las esporas presentes en el aire cada 24 h en un periodo de 7 días (West *et al.*, 2008). Por tanto, mediante este sistema se puede obtener información horaria de la cantidad de esporas presentes en el aire para ser asociada a variables ambientales u operacionales en cada momento (West y Kimber, 2015).

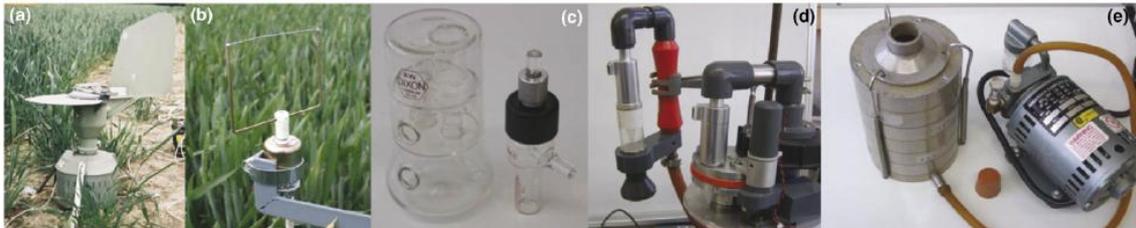


Figura 5. Tipos de sistema de muestreo de partículas aéreas. (a) Capturador Burkard. (b) Sistema de brazo rotatorio. (c) Sistema de muestreo en fase líquida. (d) Variante del Sistema Burkard. (e) Sistema Andersen (West *et al.*, 2008).

En las últimas dos décadas, la aplicación de técnicas moleculares en la detección de los patógenos causantes de las EFMV ha crecido exponencialmente, en gran parte gracias a la velocidad, especificidad y sensibilidad de sus resultados comparado con las técnicas tradicionales (Martín *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que los métodos de detección molecular en plantas resultan muy útiles en el caso de hongos causantes de EFMV, tales como *Pa. chlamydospora* (Pouzoulet *et al.*, 2013). Edwards *et al.* (2007) compararon las tres técnicas moleculares más empleadas: PCR convencional, PCR a tiempo real (qPCR) y PCR anidada, determinando que la más sensible en la detección de conidios de *Pa. chlamydospora* en muestras de agua es la PCR anidada y, sumado a esto, el uso de qPCR incrementa la exactitud de la detección y cuantificación de concentraciones bajas de muestra (Weßling y Panstruga, 2012).

El uso de la qPCR permite la cuantificación del ADN a partir de la detección de la intensidad de fluorescencia que va aumentando a medida que los ciclos de amplificación avanzan y se estima un ciclo umbral o “cycle threshold” (Ct), el ciclo al cual el incremento de la fluorescencia se considera estadísticamente relevante con respecto a la fluorescencia de fondo. Una vez obtenido el valor de Ct, éste se transporta a una curva de calibración estándar (soluciones de ADN vs valores de Ct) para obtener el número de copias del gen diana presentes en la muestra ambiental. La principal limitación de la qPCR está en que su detección/cuantificación no

distingue propágulos vivos o muertos, sin embargo la mayoría de conidios están adaptados a sobrevivir durante largos periodos de tiempo con el fin de asegurar su dispersión (West *et al.* 2008), por lo que, si los seguimientos son relativamente constantes, esta limitación no debería ser un problema.

Por su parte, la PCR anidada es una herramienta empleada cuando la concentración de ADN en la muestra es demasiado baja y consiste en una amplificación de las regiones genómicas de interés previa a la detección y/o cuantificación, ya que puede combinarse con PCR convencional o qPCR con el fin de emplearlo para la mejora de los estudios epidemiológicos y el perfeccionamiento en el manejo de las enfermedades fúngicas.

Recientemente, los últimos avances en el ámbito de la identificación de microorganismos a partir de muestras ambientales se han centrado en el manejo de potentes herramientas de secuenciación denominadas “Next Generation Sequencing” (NGS) o “High Throughput Sequencing” (HTS) (Thierry *et al.*, 2015). En la actualidad, el uso de estas técnicas de “barcoding” y “metabarcoding” están restringidas a la detección masiva de organismos presentes en muestras ambientales y al registro taxonómico de especies localizadas en regiones cuya presencia no es frecuente (Taberlet *et al.*, 2012; Lallias *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La incidencia de enfermedades de la madera de la vid se ha incrementado en los últimos 20 años y el desarrollo de nuevas herramientas que ayuden a la predicción de infección y el control de los patógenos fúngicos responsables ha cobrado una importancia cada vez mayor. Hasta ahora, no se han realizado estudios dedicados a combinar las técnicas moleculares disponibles con sistemas de captura de conidios de los patógenos responsables de EFMV, con el fin de poder hacer un seguimiento y predicción de la disponibilidad de inóculo en campo.

En este sentido, los objetivos de este trabajo son:

-Poner a punto un protocolo detección y cuantificación de *Phaeoaniella chlamydospora* mediante PCR a tiempo real.

-Aplicar el protocolo desarrollado en muestras procedentes de campo.

**3. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL
PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO DE
Phaeomoniella chlamydospora EN CAMPO**

3. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO DE *Phaeomoniella chlamydospora* EN CAMPO

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Preparación de suspensiones de conidios, extracción de ADN y preparación de diluciones de ADN

3.1.1.1. Preparación de las suspensiones de conidios

Se seleccionó un aislado representativo de *Pa. chlamydospora*, que se repicó a placas de medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) y se incubó en oscuridad a 25 °C durante 15-20 días. Una vez el hongo colonizó la superficie del medio, se añadieron 20 ml de agua destilada estéril y se raspó la superficie con una espátula para desprender los conidios. A continuación, se filtró el líquido obtenido a través de una gasa y se enrasó la suspensión a 200 ml, obteniendo una solución con alta concentración de conidios (5×10^7 conidios/ml). Para la cuantificación y ajuste de la concentración de conidios se empleó un hematocitómetro. A partir de la suspensión más concentrada se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 hasta obtener una suspensión de 5×10^3 conidios/ml.

3.1.1.2. Extracción de ADN

Previo a la extracción, se prepararon cintas de plástico de 48 mm de largo, correspondientes a un tiempo de exposición de 24 h en el sistema Burkard. Cada cinta se impregnó con silicona y se puso sobre un portaobjetos.

Se tomaron las cinco suspensiones de conidios preparadas en el apartado 1.1 y se dispusieron sobre cinco cintas de plástico, de modo que cada cinta tuviera 500 µl de su respectiva suspensión, homogéneamente repartidos por su superficie. Las cintas se dejaron

secar durante 24 horas antes de proceder a la extracción de ADN. En la extracción de ADN genómico se utilizó el kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit, Omega Bio-Tek, Norcross, GA.

Cada cinta se cortó en seis fragmentos iguales que se introdujeron en un tubo de 2 ml. En el tubo se añadieron 700 μ l de tampón P1 (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y BashingBeads (ZR BashingBead™ Lysis Tubes de 0,5 mm de diámetro) para facilitar la rotura de los conidios mediante vibración en un equipo TissueLyser (TissueLyser LT, Qiagen, Hilden, Germany) a 50 Hz durante 15 min. Las muestras se incubaron a 66 °C durante 15 min. Se añadieron 140 μ l de tampón P2 (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y se mezcló con un agitador, sometiendo después los tubos a centrifugación (15000 rpm, 10 min). Se trasladaron 450 μ l del sobrenadante resultante a un tubo Eppendorf con 600 μ l de etanol puro y 300 μ l de tampón P3 (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit). La mezcla se homogeneizó con un agitador durante unos segundos. Se transfirieron 800 μ l de la mezcla a una columna de filtrado (Hibind®DNA Mini Columns) y un tubo de 2 ml (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) para su posterior centrifugación (15000 rpm, 1 min) y se descartó el líquido. En la misma columna de filtrado se repitió este paso con el volumen restante de la mezcla. Se realizaron dos lavados de la columna con 650 μ l de tampón de lavado (kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) y centrifugación (15000 rpm, 1 min) y un paso final de centrifugación sin añadir el tampón para descartar el líquido residual. La columna se adaptó a un tubo Eppendorf con 100 μ l de IDTE 1xTE Solution pH8 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) calentado a 65 °C y se centrifugó (15000 rpm, 3 min), recuperando el líquido extraído.

3.1.1.3. Preparación de diluciones de ADN

Partiendo del producto de extracción de ADN de la solución más concentrada (correspondiente a una suspensión de $2,5 \times 10^7$ conidios/ml, ya que se dispusieron en la cinta 500 μ l de la solución de 5×10^7 conidios/ml) se prepararon diluciones seriadas 1:10 y dos diluciones intermedias 1:5 (Tabla 1).

3.1.2. Ajuste del protocolo de detección y cuantificación de conidios de *Pa. chlamydospora*

Para el ajuste del protocolo desarrollado en este trabajo se siguieron los pasos indicados en la Figura 6.

Tabla 1. Concentración de conidios (conidios/ml y conidios/cm²) de las diluciones seriadas 1:10 (D1, D2, D3, D4 y D5) e intermedias 1:5 (D3,8 y D4,8).

Dilución	conidios/ml	conidios/cm ² de cinta
D1	$2,5 \times 10^6$	260.417
D2	$2,5 \times 10^5$	26.042
D3	$2,5 \times 10^4$	2.604
D3,8	5×10^3	521
D4	$2,5 \times 10^3$	260
D4,8	5×10^2	52
D5	$2,5 \times 10^2$	26

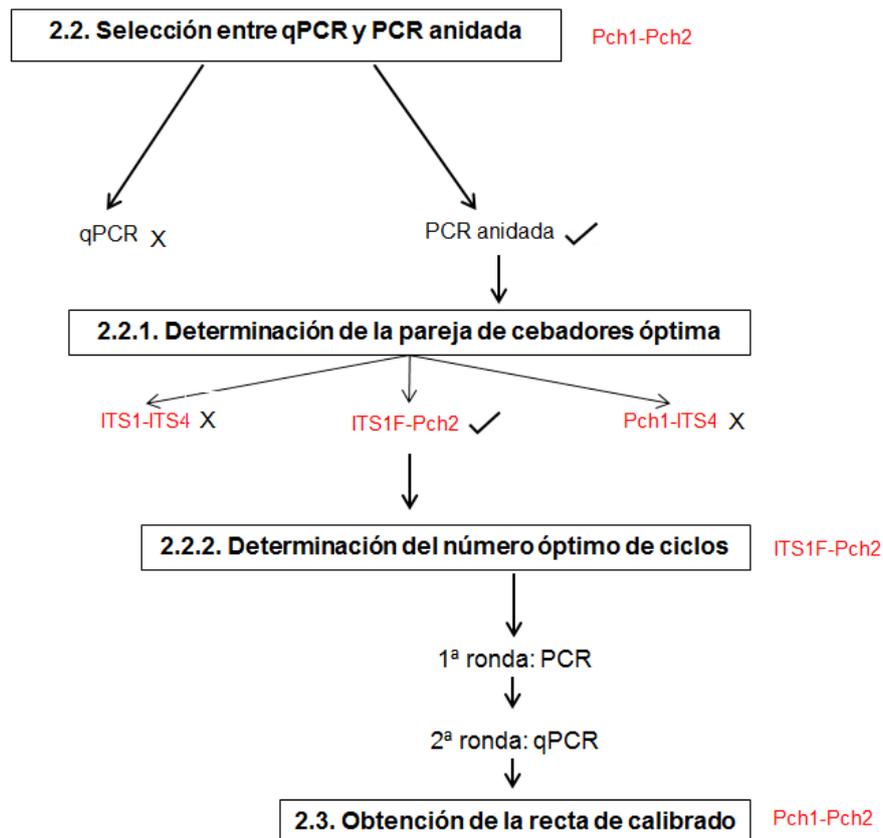


Figura 6. Esquema de los pasos seguidos en el ajuste del protocolo de detección y cuantificación de conidios de *Pa. chlamydospora*. Cada uno de los pasos mostrados en los recuadros se desarrolló mediante una PCR cuantitativa en la que se emplearon los cebadores que se emplearon los cebadores que aparecen en color rojo.

3.1.2.1. Condiciones para cada tipo de reacción

Las condiciones utilizadas en cada tipo de reacción fueron las siguientes:

- PCR. Se realizaron mezclas de reacción (25 μ l volumen total) compuestas por 2 μ l de ADN molde y alícuotas de 23 μ l procedentes de una mezcla base (Tabla 2). De esta forma, todas las muestras de ADN y sus réplicas se sometieron a las mismas condiciones experimentales. Las mezclas de reacción se dispusieron en tubos de PCR y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) bajo las condiciones de la Tabla 3. Como controles negativos se incluyeron tubos con la mezcla sin ADN.

- qPCR. Se realizaron mezclas de reacción (25 μ l volumen total) compuestas por 2 μ l de ADN molde y alícuotas de 23 μ l procedentes de una mezcla base (Tabla 2). Las mezclas de reacción se dispusieron en tubos PCR® Strip Tubes & Caps (Axygen, Corning, NY) y la qPCR se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene q 5plex hrm system (Qiagen) bajo las condiciones de la Tabla 3. Como controles negativos se incluyeron tubos con la mezcla sin ADN.

- PCR anidada. Se llevaron a cabo dos reacciones: una PCR y una qPCR en la cual se utiliza como ADN molde el producto de la reacción de PCR previa.

Tabla 2. Concentración y volumen de los componentes de la mezcla de reacción de PCR y qPCR.

Componente	Volumen	Concentración final
SYBR® Premix Ex Taq II (2 X) (Tli RNaseH Plus), Bulk	12,5 μ l	1 X
Cebador directo (μM)	1 μ l	0,4 μ M
Cebador reverso (μM)	1 μ l	0,4 μ M
Agua	8,5 μ l	

Tabla 3. Condiciones de reacción para PCR y qPCR.

Fase		PCR		qPCR	
Desnaturalización inicial		95 °C	1 min	95 °C	1 min
Amplificación	<i>Nº de ciclos</i>	25		40	
	<i>Desnaturalización</i>	95 °C	5 s	95 °C	5 s
	<i>Anillamiento</i>	62 °C	30 s	62 °C	30 s
	<i>Elongación</i>	72 °C	40 s	72 °C	40 s
	<i>Extensión final</i>	-		-	

3.1.2.2. Selección entre qPCR y PCR anidada

En ciertas ocasiones, realizar una qPCR empleando directamente los cebadores específicos de la especie en estudio no es efectivo, ya que hay poco ADN molde de la región a amplificar y, por lo tanto, el reconocimiento por parte del cebador es inespecífico y menos sensible. Una posible solución a este problema es realizar una PCR anidada, basada en una primera ronda de amplificación mediante cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa que contiene el segmento diana y, seguidamente, el producto se utiliza como molde de la segunda ronda de amplificación con los cebadores internos para la región específica.

Para determinar si en este trabajo era necesaria una PCR anidada se llevó a cabo una qPCR con los cebadores Pch1 y Pch2 (Tabla 4) específicos de *Pa. chlamydospora* que amplifican una región de 360 pb (Tegli *et al.*, 2000), como aparece en la Figura 7. Las muestras evaluadas fueron las diluciones de ADN introducidas por duplicado, determinándose así el límite de detección. De esta forma se comprobó hasta qué dilución se conseguía detectar y si era suficiente para los objetivos fijados en el trabajo o, de lo contrario, había que recurrir a una PCR anidada.

3.1.2.3. Determinación de la pareja de cebadores óptima para la primera ronda de PCR anidada

La combinación óptima de cebadores en la primera ronda de amplificación de la PCR anidada es clave a la hora de obtener un producto más o menos específico y, por lo tanto, unos resultados más sensibles y reproducibles en la qPCR.

Se comparó la eficiencia de dos combinaciones diferentes de cebadores:

- ITS1 e ITS4. El ADN se amplificó mediante la combinación de los cebadores universales ITS1 e ITS4 (Tabla 4). ITS1 amplifica una secuencia de la región 18S e ITS4 amplifica una secuencia de la región 28S del ADN ribosómico (White *et al.*, 1990), como aparece en la Figura 7.

- ITS1-F y Pch2 / Pch1 e ITS4. El ADN molde se amplificó mediante la combinación del cebador universal ITS1-F y el cebador específico de *Pa. chlamydospora* Pch2 (Tabla 4). ITS1-F amplifica una secuencia del ADN ribosómico (Gardes y Bruns, 1993) y Pch2 amplifica una secuencia específica dentro de la región ADNr-ITS (Tegli *et al.*, 2000), como aparece en la Figura 7.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) de ADN ribosómico (ADNr).

Cebador	Sentido	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS1	Directo	TCCGTAGGTGAACCTTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	Reverso	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS1-F	Directo	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes y Bruns, 1993
Pch1	Directo	CTCCAACCCTTTGTTTATC	Tegli <i>et al.</i> , 2000
Pch2	Reverso	TGAAAGTTGATATGGACCC	Tegli <i>et al.</i> , 2000

Paralelamente, el ADN molde se amplificó mediante la combinación del cebador específico de *Pa. chlamydospora* Pch1 y el cebador universal ITS4 (Tabla 4). Pch1 amplifica una secuencia específica dentro de la región ADNr-ITS1 (Tegli *et al.*, 2000) e ITS4 amplifica una secuencia del ADN ribosómico del gen 28S (White *et al.*, 1990), como aparece en la Figura 7.

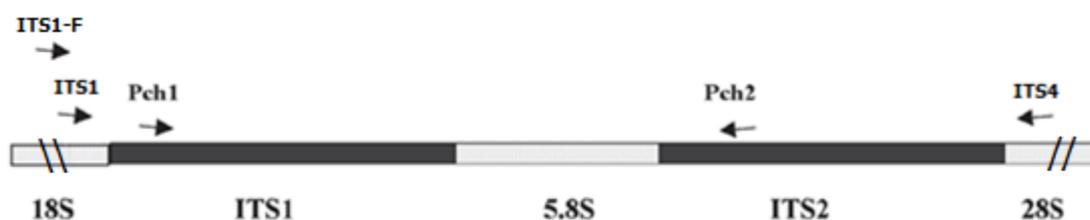


Figura 7. Localización de cada uno de los cebadores en el ADN ribosómico de *Pa. chlamydospora* (Gardes y Bruns, 1993; Korabecna, 2007; Edwards *et al.*, 2007).

Las muestras amplificadas en la PCR fueron las diluciones de ADN y se introdujeron por duplicado.

Los productos de cada PCR se emplearon como ADN molde para la correspondiente reacción de qPCR. De esta forma se determinó la calidad de las curvas obtenidas, comparando la reproducibilidad y sensibilidad demostrada por cada combinación de cebadores para seleccionar la más satisfactoria.

3.1.2.4. Determinación del número óptimo de ciclos para la primera ronda de PCR anidada

El número de ciclos en la primera ronda de amplificación de la PCR anidada ha de ser el adecuado para generar un ADN molde de qPCR suficiente para que las concentraciones más bajas de conidios puedan entrar en el límite de detección.

Se realizó una qPCR directa, tomando como muestras las diluciones de ADN, introducidas por duplicado. El ADN molde se amplificó mediante la combinación del cebador universal ITS1-F y el cebador específico de *Pa. chlamydospora* Pch2 (Tabla 4).

Se comprobó a partir de qué ciclo de qPCR se empezaba a detectar el ADN de la dilución más concentrada, el cual se tomaría como número de ciclos a aplicar en la primera reacción de amplificación de la PCR anidada.

3.1.2.5. Obtención de la recta de calibrado

La recta de calibrado se estableció representando el logaritmo decimal de concentraciones conocidas de conidios (conidios/ml) del aislado representativo de *Pa. chlamydospora*. Las muestras analizadas fueron las diluciones de ADN introducidas por triplicado.

Las muestras se sometieron a una PCR anidada utilizando los cebadores ITS1-F y Pch2 en la primera ronda de amplificación y los cebadores Pch1 y Pch2 en la segunda ronda (Tablas 2 y 3).

Los resultados obtenidos se emplearon para construir una recta de calibrado de la que se pudiera estimar la concentración de conidios de *Pa. chlamydospora* en muestras desconocidas conociendo su valor Ct ("Cycle threshold"). Finalizada la qPCR, se ejecutó un programa de curvas de fusión con el fin de identificar posibles productos inespecíficos.

3.1.3. Validación del protocolo

Con el fin de obtener puntos conocidos que validaran la recta de calibrado se emplearon las extracciones realizadas a partir de las cintas con concentraciones conocidas de conidios introducidas por duplicado (Tabla 5). Con estas muestras de validación se llevó a cabo la PCR anidada y los valores Ct obtenidos se exportaron a la recta de calibrado. Finalizada la qPCR, se ejecutó un programa de curvas de fusión con el fin de identificar posibles productos inespecíficos. Además, se cuantificó la concentración de ADN (ng/μl) en una de las cintas (cinta de validación 1.4) mediante fluorimetría con el kit Qubit Fluorometric Quantitation (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Tabla 5. Concentración de conidios en la suspensión (conidios/ml), conidios en la superficie de la cinta (conidios/cm² de cinta) y ADN (ng/μl) de las muestras de validación.

Cintas	conidios/ml	conidios/cm ² de cinta	ng/μl
1.1	2,5 x 10 ⁷	2.604.167	-*
1.2	2,5 x 10 ⁶	260.417	-
1.3	2,5 x 10 ⁵	26.042	-
1.4	2,5 x 10 ⁴	2.604	0,38
1.5	2,5 x 10 ³	260	-

* valor no calculado.

3.1.4. Validación del protocolo en muestras de campo

Las muestras de campo fueron tomadas en dos localizaciones diferentes (Albacete y Onteniente). Los viñedos seleccionados, ambos con plantas que mostraban síntomas de EFMV, correspondieron a: i) una parcela comercial de 10 años cultivada en espaldera con variedad Tempranillo en el caso de Albacete y ii) una parcela no comercial de 20 años cultivada en vaso con la misma variedad en el caso de Onteniente. El periodo de toma de muestras fueron los meses de Abril y Mayo de 2015. Semanalmente se recogieron dos muestras de partículas aéreas procedentes de cada localización. Además, se descargaron los datos correspondientes a las variables ambientales: temperatura media (°C), HR media (%) y precipitación (mm),

registrados diariamente durante dicho periodo en estaciones agroclimáticas próximas a las parcelas de estudio.

Para la captura aérea de los conidios presentes en campo se montaron trampas de conidios. Cada trampa consistió en una cinta de plástico siliconada de 48 mm de largo fijada a un portaobjetos de cristal aplicando esmalte en los márgenes laterales de la cinta para asegurar su correcta fijación. Además, el portaobjetos con la cinta siliconada se sujetó en una estructura que mantuviera el portaobjetos en orientación horizontal y pudiera afianzarse en el tronco de la viña (Figura 8). De esta forma, en cada parcela objeto de estudio se expusieron semanalmente dos portaobjetos (portaobjetos A y B), que se fijaron al tronco de dos plantas de la parcela, separadas al menos 10 m.

Al inicio del proceso de extracción se incluyó un paso adicional en el caso de las muestras de campo, que consistió en la eliminación de los márgenes de la cinta que habían sido fijados con esmalte al portaobjetos. Esto no supuso ningún cambio en la superficie total de captura de la cinta, ya que los extremos de la cinta se prolongaron 0,5 cm para aplicar en ellos el esmalte fijador.

Tras la extracción se llevó a cabo la PCR anidada de las muestras de campo y los valores Ct obtenidos se exportaron a la recta de calibrado. Finalizada la qPCR se ejecutó un programa de curvas de fusión con el fin de identificar posibles productos inespecíficos.

Los productos de qPCR positivos obtenidos para el hongo *Pa. chlamydospora* se confirmaron mediante electroforesis (120 V, 80 mA) (PS 304 minipac II, Apelex) en gel de agarosa al 2% (agarosa D-1 Low EEO; Conda, Madrid, España) teñidos con 3 μ l de REALSAFE (REALSAFE nucleic acid staining solution 20.000x; Real). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Gene-ruler 0,5 μ g/ μ ; Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) como referencia. El gel se dejó correr (100 V) durante 2 h. La visualización de los productos de PCR se realizó bajo luz UV en un transiluminador.

Los productos de qPCR positivos confirmados en el gel de agarosa se extrajeron por corte de las bandas bajo luz UV en un transiluminador. Los productos extraídos fueron purificados del gel de agarosa siguiendo el protocolo de HBL-Agarosa QuickClean (Dominion mbl, Córdoba, España) y posteriormente secuenciados con el cebador Pch2 a través del servicio de secuenciación de la empresa MacroGen (MacroGen Europe, Amsterdam, The Netherlands).



Figura 8. (a) Trampa de conidios diseñada. (b) Detalle de gotas de lluvia dispuestas en la superficie de la trampa de conidios. (c) Parcela de Onteniente donde se pueden distinguir vides sintomáticas de EFMV.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Ajuste del protocolo

3.2.1.1. Selección entre qPCR y PCR anidada

Para determinar la eficacia de las dos técnicas moleculares se compararon los valores de Ct resultantes. Con la qPCR se obtuvieron valores de Ct altos para muestras cuya concentración de ADN era elevada (Figura 9). Las diluciones D2, D3 y D4 presentaron valores de Ct de 29,96; 35,91 y 36,68 ciclos, respectivamente, y la dilución D5 no llegó a ser detectada. Asumiendo un

100% de eficiencia de reacción, la diferencia de ciclos entre dos diluciones (1:10) es aproximadamente de 3,3 ciclos ($2^{3,3}=10$). Los elevados valores de Ct que se obtuvieron en este ensayo, sin una relación lineal aparente (entre la dilución 3 y la 4 se observa menos de un ciclo de diferencia) conducen a pensar que el método utilizado es poco sensible cuando se trabaja con concentraciones de ADN bajas. El límite de detección observado (LD) fue inferior al que se pretendía conseguir en este trabajo y se concluyó, por tanto, que el protocolo debía desarrollarse en base a una PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la detección (Edwards *et al.*, 2007).

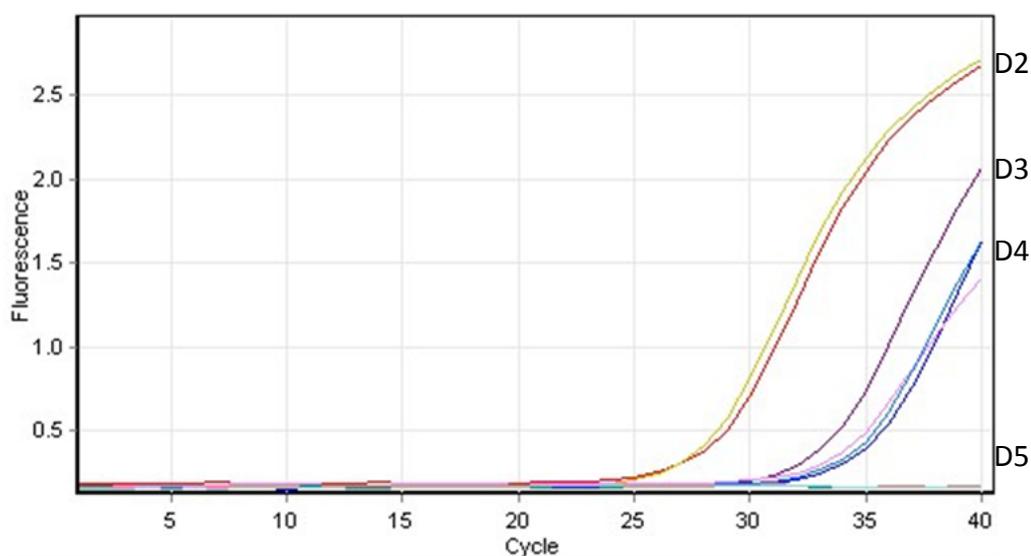


Figura 9. Curvas de amplificación, donde se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia emitida. Diluciones por duplicado (Tabla 1) amplificadas con la pareja de cebadores Pch1 y Pch2.

3.2.1.2. Determinación de la pareja de cebadores óptima de la primera ronda de PCR anidada

Se descartó la primera combinación de cebadores universales (ITS1 e ITS4), puesto que para la aplicación de este protocolo en campo, hay que tener en cuenta que existe gran variedad de especies fúngicas que pueden estar presentes en las muestras ambientales obtenidas. Por lo tanto, las uniones inespecíficas de Pch1 y Pch2 a los productos de PCR podrían tener una representatividad tan alta que incrementara la detección de falsos positivos de *Pa. chlamydospora*. De esta forma, se procedió a probar la eficiencia de una pareja de cebadores donde se combinara un cebador universal y un cebador específico de *Pa. chlamydospora* con el fin de incrementar la especificidad del proceso.

Las eficiencias demostradas por las combinaciones de cebadores ITS1-F y Pch2 y Pch1 e ITS4 fueron similares entre sí (Figura 10). Tanto los valores de Ct y las curvas de fusión de las diluciones como los LD obtenidos en ambas qPCR (una para cada combinación de cebadores) se consideraron iguales. La pareja de cebadores seleccionada para la primera ronda de amplificación de PCR anidada fue ITS1-F y Pch2.

3.2.1.3. Determinación del número de ciclos óptimo de la primera ronda de PCR anidada

Las diluciones con mayor y menor concentración de ADN que se incluyeron en este paso fueron D2 y D5 respectivamente, resultando D4 la dilución con menos concentración de ADN detectada. Los valores de Ct obtenidos para cada dilución fueron: 20,99 ciclos para D2; 25,42 ciclos para D3 y 28,35 ciclos para D4. Por tanto, se determinó que el número de ciclos óptimo para la primera ronda de PCR anidada era de 25 ciclos. De este modo, se obtuvo una mayor concentración de producto de PCR para la unión de Pch1 y Pch2 durante la ronda de qPCR y, en consecuencia, un aumento del LD, es decir, de la sensibilidad del proceso de detección y posterior cuantificación.

3.2.2. Obtención de la recta de calibrado y validación del protocolo

La qPCR realizada con las diluciones seriadas demostró que la mínima concentración de conidios capaz de ser detectada fue de 5×10^2 conidios/ml, es decir, el LD se hallaba fijado en la dilución D4.8. La dilución D1 se excluyó, ya que su alta cantidad de producto de PCR inicial impedía diferenciar significativamente la fluorescencia basal y la fluorescencia inicial emitida, no pudiendo determinarse el valor de Ct. En las curvas de fusión se observó que la dilución D5 presentaba una gran cantidad de producto inespecífico probablemente atribuible a dímeros entre los cebadores o "primer dimers". Por lo tanto, la recta de calibrado se ajustó con las diluciones: D2; D3; D3,8; D4 y D4,8 con una eficiencia de reacción de 0,65442 y un valor de R^2 de 0,99143 (Figura 11).

Cada muestra perteneciente a las validaciones presentó un valor de Ct igual al de la dilución con la correspondiente cantidad de ADN (Tabla 6), lo cual significó que el protocolo de extracción y cuantificación fue el adecuado.

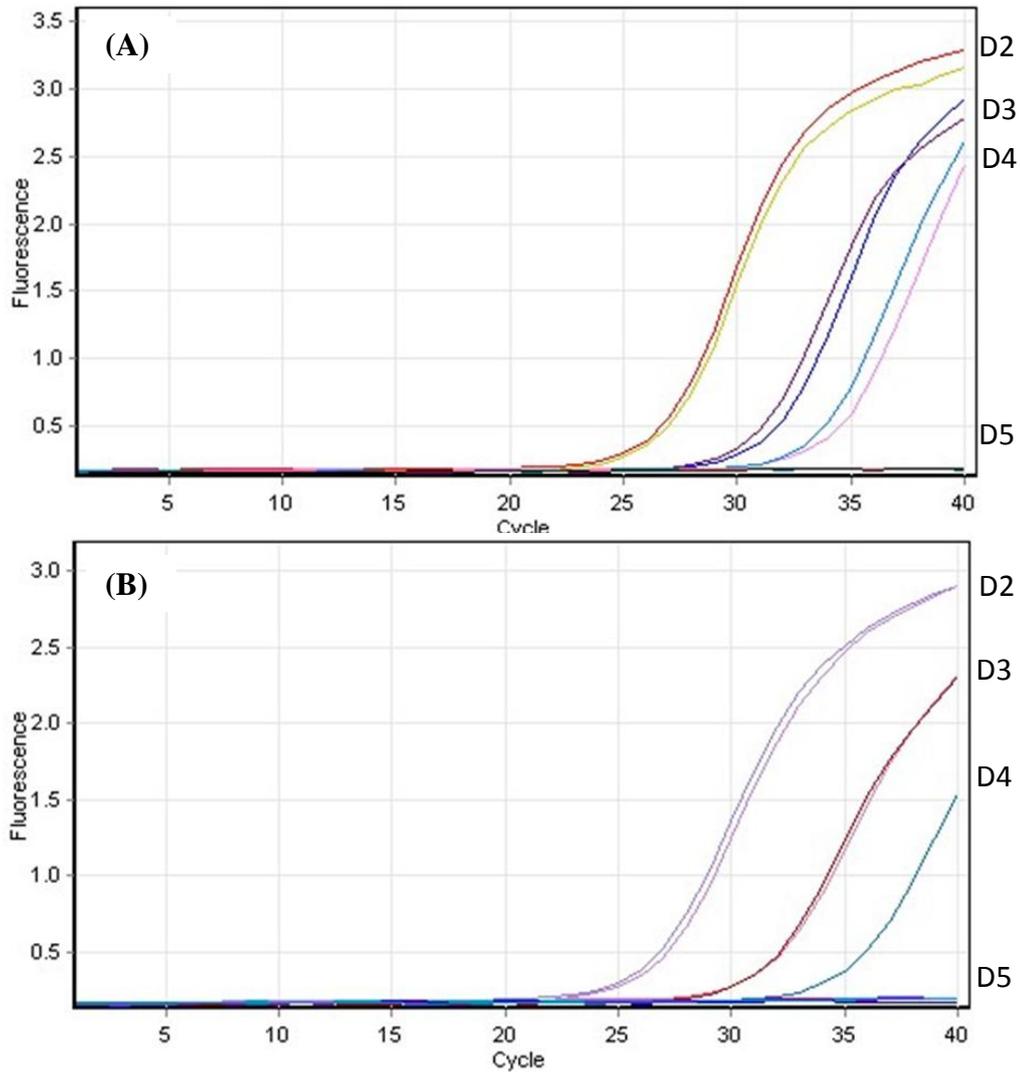


Figura 10. Curvas de amplificación, donde se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia emitida. Diluciones por duplicado (Tabla 1) amplificadas con: (A) pareja de cebadores ITS1-F y Pch2 y (B) pareja de cebadores Pch1 e ITS4.

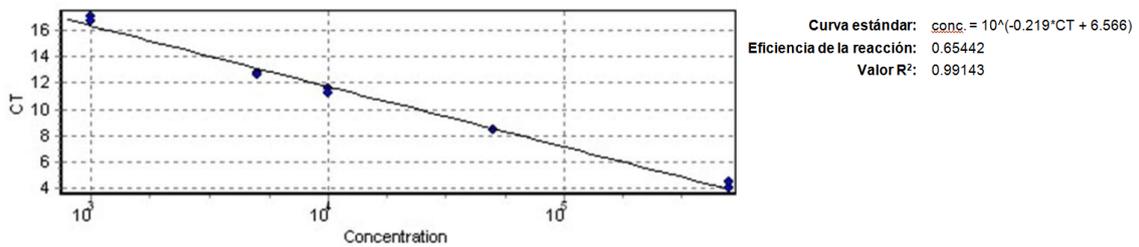


Figura 11. Recta de calibrado ajustada con las diluciones D2; D3; D3,8; D4 y D4,8 (Tabla 2), donde se representa la concentración de ADN frente al valor de Ct de cada una de las diluciones.

La cinta de validación 1.4 presentó un valor de Ct próximo al de la dilución D3, por lo tanto se asumió que la concentración de ADN mínima capaz de detectarse fue de 76 pg/ μ l, es decir, la correspondiente a la dilución que marca el LD. Este LD puede compararse con el obtenido en el trabajo de Tegli *et al.* (2000) donde se emplearon los mismos cebadores con muestras de ADN procedentes de cultivo puro de *Pa. chlamydospora*, llegando a detectar hasta 10 pg/ μ l. Otros autores han realizado el mismo tipo de estudios utilizando cebadores de diseño propio, de manera consiguieron un LD a 100 fg/ μ l a partir de qPCR en muestras de madera infectada (Martín *et al.*, 2012) y 50 fg/ μ l a partir de una PCR anidada con muestras de suelo de vivero (Whiteman *et al.*, 2000). Otro parámetro que hay que tener en cuenta a la hora de evaluar el LD obtenido es la concentración de conidios por cm^2 de cinta procedente del sistema de muestreo, siendo la concentración mínima detectada 52 conidios/ cm^2 , o lo que es lo mismo, lo correspondiente a la dilución D4.8 (500 conidios/ml). En el trabajo de Edwards *et al.* (2007) se realizaron estudios similares a partir de muestras de agua obtenidas en vivero. Para este fin se emplearon dos parejas de cebadores diseñados por otros autores, obteniendo cuantificaciones con una alta variabilidad entre muestras repetidas, ya que sus LD oscilaban entre 8 y 3.452 conidios/ml para una pareja de cebadores y 1-17.394 conidios/ml para otra. En un futuro sería interesante probar los cebadores diseñados por otros autores para la posible mejora en la sensibilidad de este protocolo.

Tabla 6. Valores promedio de Ct para las diluciones (Tabla 1) y validaciones (Tabla 5) amplificadas con los cebadores Pch1 y Pch2.

Muestras	Valores promedio de Ct	Desviación estándar
D2	4,26	0,31
D3	8,42	0,02
D3.5	11,40	0,21
D4	12,73	0,08
D4.5	16,85	0,25
1.1	-*	-
1.2	-	-
1.3	3,88	0,02
1.4	6,77	0,07
1.5	10,75	0,16

* valor no calculado.

3.2.3. Validación del protocolo en muestras de campo

En el total de muestras de campo analizadas se detectaron 9 positivos por debajo del LD fijado para valores de Ct. Las muestras positivas se evaluaron por electroforesis en un gel de agarosa para descartar la posible interferencia de otras especies fúngicas, ya que los cebadores Pch1 y Pch2 presentan cierta similitud con las secuencias de otros organismos y pueden dar lugar a anillamientos poco específicos durante la amplificación, reduciendo la sensibilidad del proceso (Edwards *et al.*, 2007).

El gel de agarosa con los productos de qPCR evidenció la presencia de dos bandas, tanto en los productos de las diluciones como en los positivos de campo obtenidos (Figura 12). Por el tamaño del amplicón, la banda superior correspondía a los productos de 600 pb generados en la primera ronda de amplificación, mientras que la banda inferior, de 360 pb, correspondía a los productos de la segunda ronda de amplificación. Para comprobar que efectivamente se había detectado la especie *Pa. chlamydospora* se secuenciaron los productos de qPCR y se determinó que los productos de ambas bandas pertenecían a *Pa. chlamydospora*. Las secuencias obtenidas presentaron un 100% de similitud con la secuencia del aislado CBS 229.95 de *Pa. chlamydospora* depositado en la base de datos GenBank, coincidiendo el fragmento del producto secuenciado con el Espaciador Interno Transcrito 2 y parcialmente con el gen de ARN ribosomal 5.8S (GenBank: AY772237.1).

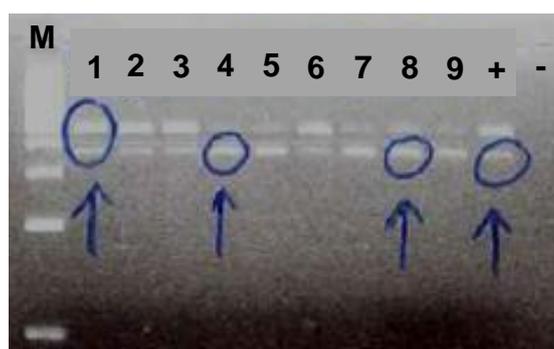


Figura 12. Productos de PCR anidada correspondientes a muestras aéreas de campo positivas para conidios de *Pa. chlamydospora*. M: 3 μ l de marcador GeneRuler 100 pb Plus; 1-9: positivos obtenidos en los portaobjetos A (Tabla 7); (+): control positivo de ADN puro; (-): control negativo.

En la parcela localizada en Onteniente se detectaron 7 positivos (5 en el portaobjetos A y 2 en el portaobjetos B) y en la de Albacete se detectaron 2 positivos (ambos en el portaobjetos A) (Tabla 7; Figuras 13, 14 y 15). En las muestras obtenidas en ambas parcelas, el portaobjetos A presentó mayor número de positivos y, por lo general, la semana en que se detectaron positivos en ambos portaobjetos, había mayor cantidad de conidios cuantificados en el portaobjetos A que en el B (Tabla 7).

La alta cantidad de positivos en la parcela de Onteniente podría deberse a que se trata de un viñedo con un mayor número de plantas que mostraban síntomas de EFMV y, por tanto, con una mayor probabilidad de presentar inóculo de *Pa. chlamydospora* en el aire. En comparación, el número de positivos en la parcela de Albacete fue mucho menor, lo que podría explicarse por el hecho de que es un viñedo comercial que cumple con las medidas recomendadas en el manejo de la enfermedad. Además, en el caso de la parcela de Albacete, se trata de un viñedo 10 años más joven que el de Onteniente, lo cual es un dato a tener en cuenta, ya que viñas de más edad tienden presentar elevados niveles de infección por hongos de madera tales como *Pa. chlamydospora* (Larignon y Dubos, 2000).

Tabla 7. Concentración de conidios (conidios/cm²) cuantificada en los portaobjetos A y B de las parcelas de Onteniente y Albacete las semanas en que se obtuvieron positivos para *Pa. chlamydospora*.

	Periodo de muestreo	Concentración de conidios (conidios/cm ² de cinta)	
		Portaobjetos A	Portaobjetos B
Onteniente	18/04-24/04	77	941
	25/04-01/05	1.630	83
	02/05-08/05	119	0
	09/05-15/05	4.388	0
	16/05-22/05	218	0
Albacete	14/04-20/04	103	0
	05/05-12/05	77	0

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL

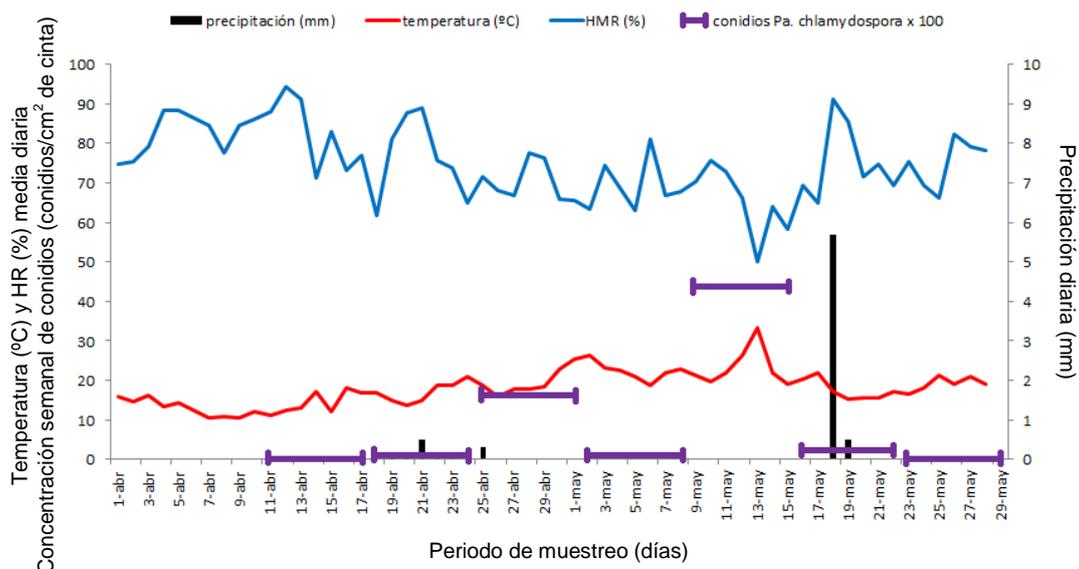


Figura 13. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos A de Onteniente.

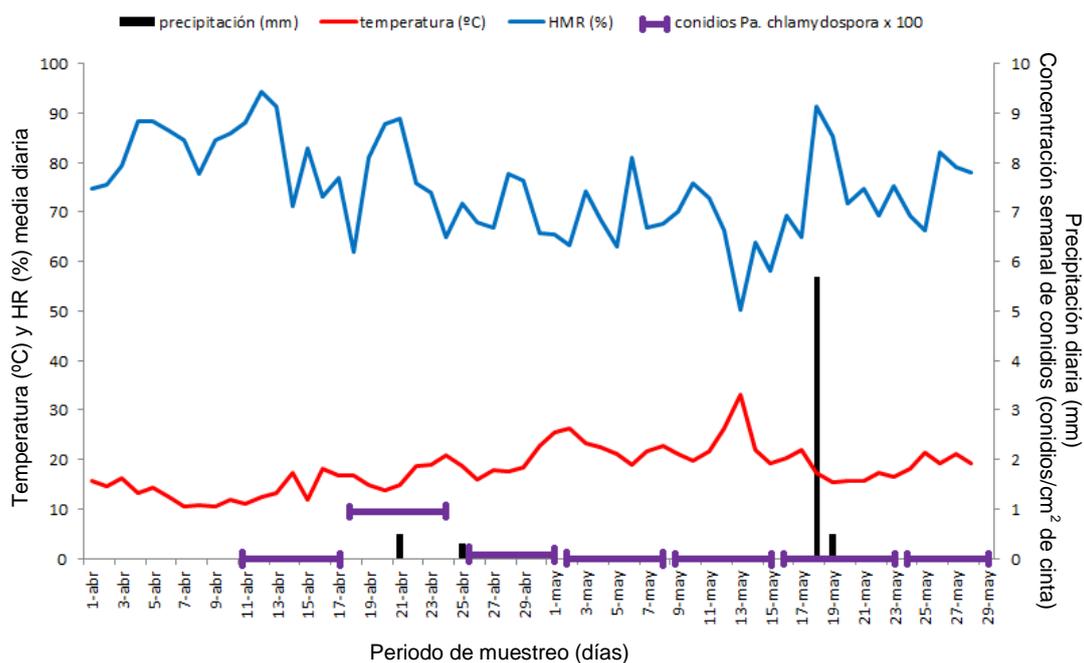


Figura 14. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos B de Onteniente.

La mayoría de trabajos basados en los hongos responsables de las EFMV que han recopilado datos meteorológicos se han centrado en determinar las condiciones ambientales favorables

para la infección de, principalmente, Botryosphaeriaceae, obteniendo resultados que difieren entre sí en función de la zona en que se realizaron los estudios (Serra *et al.*, 2008; Luque *et al.*, 2014a; Luque *et al.*, 2014b).

Existen pocos ensayos que busquen relaciones entre el momento de dispersión de conidios de *Pa. chlamydospora* y las condiciones ambientales. En uno de ellos, Quaglia *et al.* (2009), se estudiaron diez cultivares de vid en Italia, determinando que la liberación de conidios de este hongo tiene lugar durante y después de eventos de lluvia lo cual, en general, puede apreciarse en los resultados de Onteniente y Albacete (Figuras 13 y 15). En la parcela de Onteniente, los positivos de las semana que comprenden del 18/04 al 24/04 y del 16/05 al 22/05 coinciden con eventos de lluvia y los positivos de las semanas que comprenden del 25/04 al 01/05 y del 02/05 al 08/05 aparecen tras las precipitaciones de Abril. En la parcela de Albacete, uno de los dos positivos detectados coincidió con el máximo de precipitaciones registrado. En el estudio de Quaglia *et al.* (2009) también se demostró una relación entre la temperatura y la presencia de conidios en el aire, ya que la captura de conidios raramente se dio en los meses de frío, a pesar de las precipitaciones, o en los meses de mucho calor (Quaglia *et al.*, 2009).

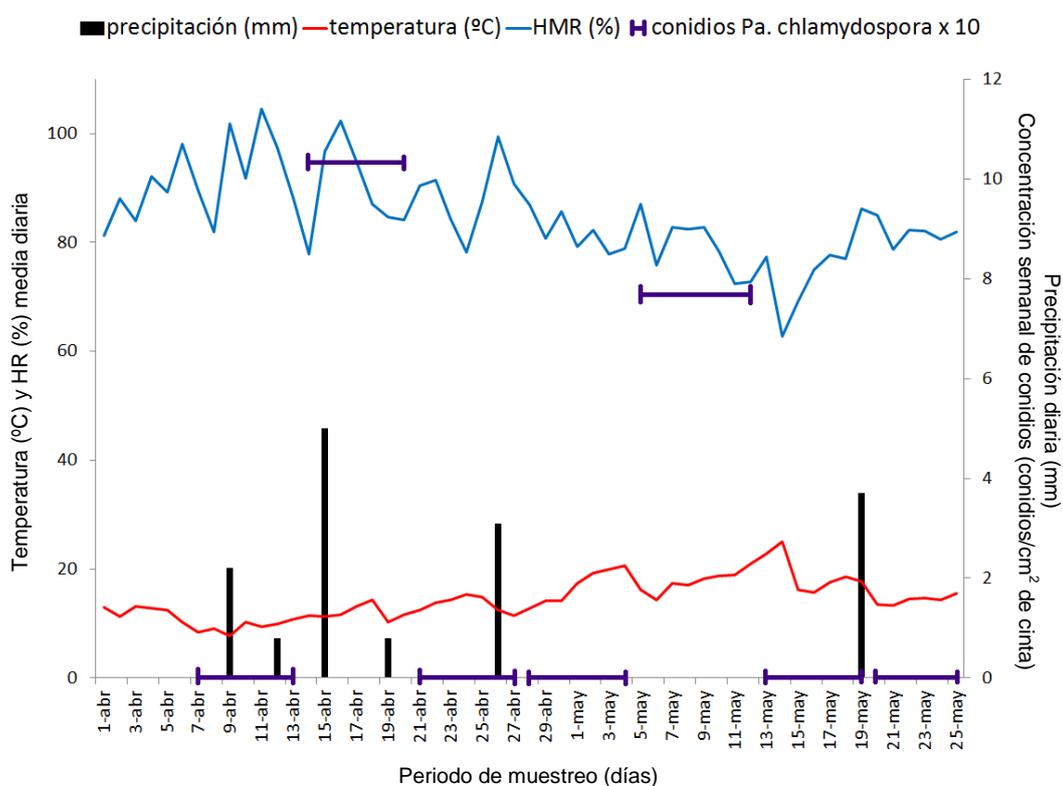


Figura 15. Representación de las condiciones ambientales y la concentración de conidios (conidios/cm² de cinta) detectada y cuantificada semanalmente en los portaobjetos A de Albacete.

Uno de los datos obtenidos que contrastan con estos resultados es el pico de 4.388 conidios/cm² de cinta cuantificado en la semana comprendida entre los días 09/05 y 15/05 (Tabla 7; Figuras 12 y 13) que coincide con el máximo de temperatura y el mínimo de HR registrado durante el periodo de muestreo. Hay que remontarse hasta dos semanas atrás desde esas fechas para encontrar los eventos de lluvia más próximos en el tiempo, por lo que las condiciones de temperatura y humedad parecen tener un efecto sobre la presencia de conidios de *Pa. chlamydospora* en el aire. Estos resultados indican que los conocimientos que se tienen acerca de la influencia de las condiciones ambientales sobre la dispersión de conidios de *Pa. chlamydospora* son incompletos y que son necesarios más estudios sobre la epidemiología de este hongo.

Finalmente, señalar que queda demostrada la validez del protocolo de detección y cuantificación de conidios de *Pa. chlamydospora* desarrollado en este trabajo y su aplicabilidad en campo. Con lo cual, este protocolo podría hacerse extensible a todas las especies fúngicas asociadas a las EFMV con interés epidemiológico, siempre y cuando se tengan los cebadores adecuados para tales fines.

El uso de técnicas moleculares resulta una alternativa a la detección y cuantificación por microscopía de conidios a partir de muestras ambientales de aire. El microscopio empleado con este objetivo es una herramienta con grandes inconvenientes, ya que supone llevar a cabo un trabajo largo y tedioso, requiriendo para ello operadores cualificados en la distinción de esporas y, además, no proporcionan la posibilidad de cuantificar especies fúngicas con esporas cuya identificación visual es inviable por su pequeño tamaño o dificultad para distinguirlas de otras especies con morfología similar.

En este trabajo se combinaron técnicas moleculares (PCR anidada y qPCR) con un sistema de captura de conidios basado en portaobjetos cuya aplicabilidad es extensible a otros tipos de capturadores, en particular al sistema Burkard. Esta combinación de herramientas podría dar lugar al desarrollo de métodos que tengan como finalidad la predicción de las EFMV con un margen de tiempo adecuado para el empleo eficiente de las medidas de control existentes. Por otro lado, el protocolo desarrollado podría utilizarse como herramienta de apoyo a la toma de decisiones en el seguimiento de los patógenos realizado durante el periodo de cultivo, ya que presenta la capacidad de alertar sobre los incrementos de inóculo aéreo en ciertas épocas del año. Con el desarrollo de estos sistemas de predicción se podría obtener resultados que

ayudaran a determinar la cantidad de inóculo necesaria para iniciar una epidemia, puesto que la importancia del inóculo aéreo no ha sido previamente estudiada de forma detallada para muchos hongos patógenos con esporas de difícil identificación visual (West *et al.*, 2008).

3.3. Conclusiones

- Se ha puesto a punto un protocolo de detección y cuantificación de conidios de *Phaeomoniella chlamydospora* basado en la combinación de técnicas moleculares y sistemas de muestreo de partículas aéreas. El límite de detección se situó en 52 conidios/cm² de cinta de captura.
- Se ha comprobado que el protocolo desarrollado puede aplicarse a muestras ambientales procedentes de viñedos con síntomas de enfermedades fúngicas de la madera de la vid, determinándose que los conidios de *Phaeomoniella chlamydospora* están presentes en el aire durante y después de eventos de lluvia y asociados a diferentes condiciones ambientales de HR y temperatura.
- El protocolo desarrollado podrá adaptarse a otros sistemas de muestreo de partículas aéreas como el sistema Burkard, y hacerse extensible a la detección y cuantificación de otros patógenos fúngicos aéreos responsables de enfermedades fúngicas de la madera de la vid, para el apoyo a la toma de decisiones orientadas al manejo de estas enfermedades.

4. BIBLIOGRAFÍA

4. BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ-BRISACH, C.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2015). Detection of Grapevine Fungal Trunk Pathogens on Pruning Shears and Evaluation of Their Potential for Plant Infection. *Plant Disease*. doi: 10.1094/PDIS-12-14-1283-RE.
- AHIMERA, N.; GISLER, S.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T. J. (2004). Effects of Single-Drop Impactions and Natural and Simulated Rains on the Dispersal of *Botryosphaeria dothidea* Conidia. *Ecology and Epidemiology*. **11**: 1189-1197.
- BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOUMANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*. **2**: 243-265.
- CROUS, P.W.; GAMS, W. (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*. **39**: 112-118.
- 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.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. **2**: 113-118.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. (2011). Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*. **9**: 1041-1055.
- JACKSONAB, S. L.; BAYLISS, K. L. (2011). Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology*. **60**: 801-810.

- KORABECNA M. (2007). The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. pp. 783-787.
- LARIGNON, P.; DUBOS, B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea*. **39**: 184-189.
- LUQUE, J.; ELENA, G.; ARMENGOL, J.; LEGORBURU, J. (2014a). Las enfermedades de la madera de la vid: reflexiones sobre un panorama complejo. *Phytoma España*. **260**: 18-24.
- LUQUE, J.; ELENA, G.; GARCÍA-FIGUERES, F.; REYES, J.; BARRIOS, G.; LEGORBURU, F.J. (2014b). Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **20**: 134-143.
- MAGRAMA (2014). Guía de gestión integrada de plagas: “uva de transformación”.
- MAGRAMA (2015). Temas: Vitivinicultura, visto el 20 de 5 de 2015 en: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/>
- MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. **5**: 28-39.
- 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*. **11**: 3985-3991.
- POUZOLET, J.; MAILHAC, N.; COUDERC, C.; BESSON, X.; DAYDÉ, J.; LUMMERZHEIM, M.; JACQUES, A. (2013). A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**: 10163-10175.

- QUAGLIA, M.; COVARELLI, L.; ZAZZERINI, A. (2009). Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. **48**: 84-91.
- 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.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R.; BATTANY, M.; BETTIGA, L. J.; GISPERT, C.; MCGOURTY, G.; RONCORONI, J.; SMITH, R.J.; VERDEGAAL, P.; GUBLER, W.D. (2010). Botryosphaeriaceae Species Spore-Trapping Studies in California Vineyards. *Plant Disease*. **6**: 717-724.
- VAN NIEKERK, J.M.; CALITZ, F.J.; HALLEEN, F.; FOURIE, P.H. (2010). Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. **127**: 375-390.
- VAN NIEKERK, J.M.; HALLEEN, F.; FOURIE, P.H. (2011). Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. **50**: 139-150.
- 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.
- WEßLING, R.; PANSTRUGA, R. (2012). Rapid quantification of plant-powdery mildew interactions by qPCR and conidiospore counts. *Plant Methods*. **8**: 35-45.
- WEST, J.S.; ATKINS, S.D.; EMBERLIN, J.; FITT, B.D.L. (2008). PCR to predict risk of airborne disease. *Trends in Microbiology*. **8**: 380-387.
- WEST, J.S.; KIMBER, R.B.E. (2015). Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology*. **166**: 4-17.

WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. 315-322.

WHITEMAN, S.A.; JASPERS, M.V.; STEWART, A.; RIDGWAY, H.J. (2002). Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. New Zealand Plant Protection. **55**: 139-145.