



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES
Máster Universitario en Sanidad y Producción Vegetal

**Caracterización de la sensibilidad de portainjertos
a *Phaeoacremonium minimum*, agente causal de la
enfermedad de Petri y la Yesca de la vid**

Curso Académico: 2018/2019

AUTOR: ESTER ABARQUERO DIEZHANDINO

TUTOR: Dr. JOSEP ARMENGOL FORTÍ

COTUTOR: Dra. MÓNICA BERBEGAL MARTÍNEZ

VALENCIA, Septiembre de 2019

Tipo Licencia



TÍTULO

Caracterización de la sensibilidad de portainjertos a *Phaeoacremonium minimum*, agente causal de la enfermedad de Petri y la Yesca de la vid

RESUMEN

La enfermedad de Petri en planta joven y la Yesca en planta adulta son enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) que han sido ampliamente estudiadas en los últimos años dados las importantes pérdidas que causan en el cultivo. Ambas se asocian con diferentes patógenos fúngicos, entre ellos diversas especies de género *Phaeoacremonium*, siendo *Pm. minimum* (= *P. aleophilum*) la especie más frecuente en todo el mundo. Actualmente, no existen medidas eficientes para la completa erradicación de los hongos asociados a las EFMV, por lo que el objetivo fundamental es mejorar la calidad sanitaria del material de propagación e intentar reducir las infecciones causadas por estos patógenos en el viñedo. Estudios preliminares realizados con varios portainjertos comerciales comúnmente utilizados en España, han demostrado que existe variabilidad en la colonización de la madera de la vid por diferentes especies de hongos asociados a EFMV, resultando en diferencias significativas en el desarrollo vegetativo de los portainjertos. Estos resultados son prometedores y sugieren que nuevos estudios serían necesarios para determinar el potencial que el uso de diferentes materiales vegetales ofrece como estrategia de manejo de las EFMV. En el presente trabajo se caracteriza la susceptibilidad de 48 portainjertos de vid comúnmente utilizados en programas de mejora, asociada a la colonización de *Pm. minimum* en plantas inoculadas. Para ello se llevó a cabo la cuantificación de la biomasa del patógeno mediante PCR a tiempo real. Además, se obtuvo una curva patrón a partir de la cual se establecieron los parámetros de detección del patógeno en material vegetal. Los resultados del aislamiento y cuantificación, fueron muy variables, incluso entre varias repeticiones de un mismo material donde se detecta al patógeno y sin embargo el aislamiento no resultó ser positivo. Gracias a la cuantificación en fg/μl se encontraron varios materiales muy tolerantes a la infección por *Pm. minimum* puesto que apenas se encontró material fúngico en ellos.

Palabras clave: resistencia, enfermedades fúngicas de la madera de la vid, mejora genética.

Autor del TFM: Dña. Ester Abarquero Diezhandino

Valencia, Septiembre de 2019

Tutor académico: Dr. D. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Dra. Dña. Mónica Berbegal Martínez

TITLE

Characterization of the sensitivity of rootstocks to *Phaeoacremonium minimum*, causal agent of Petri and Esca diseases of grapevine.

SUMMARY

Petri disease in young plants and Esca in adult plants are grapevine trunk diseases (GTD) that have been widely studied in recent years given the significant losses they cause in grapevine crops. Both diseases are associated with different fungal pathogens, including various species of the *Phaeoacremonium* genus, with *Pm. minimum* (= *P. aleophilum*) being the most frequent one. Currently, there are no efficient measures for the complete eradication of fungi associated with GTD, so the main objective is to improve the sanitary quality of the propagation material and try to reduce the infections caused by these pathogens in the vineyard. Preliminary studies carried out with several commercial rootstocks commonly used in Spain, have shown that there is variability in the colonization of grapevine wood by different species of fungi associated with GTD, resulting in significant differences in the vegetative development of rootstocks. These results are promising and suggest that new studies would be necessary to determine the potential that the use of different plant materials offers as aged management strategy. In this work we studied the susceptibility of 48 vine rootstocks commonly used in breeding programs, associated with the colonization of *Pm. minimum* in inoculated plants. A quantification of the biomass of the pathogen was carried out by means of real-time PCR. In addition, a standard curve was obtained from which the pathogen detection parameters in plant material were established. The results of the isolation and quantification were very variable, even between several repetitions of the same material where the pathogen was detected and the isolation wasn't positive. Thanks to the quantification in fg / μ l several materials were found to be very tolerant to Pm minimum infection since fungal material was hardly found in them.

Keywords: resistance, grapevine trunk diseases, plant breeding

Author of the TFM: Dña. Ester Abarquero Diezhandino

Valencia, September 2019

Academic tutor: Dr. D. Josep Armengol Fortí

Cotutor: Dra. Dña. Mónica Berbegal Martínez

Valencia, September 2019

Agradecimientos

Quiero agradecer a los dos tutores de este trabajo final de máster, el Dr. Josep Armengol Fortí y la Dra. Mónica Berbegal Martínez, por abrirme las puertas de este laboratorio y tener la oportunidad de aprender y trabajar en el Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV). Sin ellos, y sin su paciencia este trabajo no sería posible.

Agradecer a mi familia por el apoyo mostrado durante este año lejos de casa, a mis amigos por todos esos días en los que han contado aun estando sin mí,

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.Contexto.....	1
I.2. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid.....	3
I.2.1.Principales enfermedades y su sintomatología.....	3
I.2.2. Problemática.....	5
I.2.3. Manejo de las EFMV.....	6
I.2.4. <i>Phaeoacremonium minimum</i>	7
I.3. Técnicas moleculares para la detección de EFMV.....	10
II. OBJETIVOS.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
III.1.Aislamiento en medio de cultivo.....	13
III.2. PCR cuantitativa.....	14
III.2.1. Extracción de ADN.....	14
III.2.2 Detección mediante qPCR.....	14
III.2.2.1 Preparación de diluciones de ADN (estándar de concentración).....	14
III.2.2.2. Reactivos y condiciones de reacción.....	15
III.3. Análisis estadístico.....	16
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
V. CONCLUSIONES.....	24
VI. BIBLIOGRAFIA.....	25

Índice de figuras

- **Figura 1.-** Evolución de la superficie de hectáreas plantadas de viñedo en España desde la campaña 2008/2009 hasta la campaña 2012/2013 (Fuente: MAPA, 2019).....1
- **Figura 2.-** Entrada de uva y producción de vino de productores ≥ 1.000 hl por ccaa y color de 1 de agosto a 31 de mayo 2019 (hl). (Fuente: MAPA, 2019).....2
- **Figura 3.-** Sintomatología en madera de la Yesca y de la Muerte por *Botryosphaeria*. (Fuente: Mondello y col., 2018)4
- **Figura 4.-** Enfermedad de Petri y síntomas foliares y vasculares del pie negro. (Fuente: Gramaje y col., 2015).....5
- **Figura 5.-** Estructura ramificada de las hifas y diferentes morfologías de los conidios de *Pm. minimum*. Fuente: (Gramaje y col., 2015)8
- **Figura 6.-** Ciclo de vida de *Pm. minimum* causando enfermedades de la madera de la vid. Los asteriscos indican las principales formas de diseminación del inóculo. Fuente: (Gramaje y col., 2015)..... 10
- **Figura 7.-** Proceso de inoculación de patrones con el patógeno *Pm. minimum*13
- **Figura 8.-** Curva patrón, parámetros y límite de detección (LD) para la cuantificación del ADN de *Pm. minimum* a partir del protocolo descrito por Pouzolet et al. (2016)..... 17
- **Figura 9.-** Porcentaje de plantas afectadas por *Pm. minimum* según los resultados de aislamiento positivo a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación..... 19
- **Figura 10.-** Concentraciones de ADN del patógeno (fg/ μ l) obtenidas para cada material (3 plantas independientes) a los 45 días de la inoculación. Los asteriscos rojos marcan las plantas en las que se detectó ADN y sin embargo no se consiguió aislar el patógeno.20
- **Figura 11.-** Concentraciones de ADN del patógeno (pg/ μ l) obtenidas para cada material (promedio de 3 plantas) a los 45 días de la inoculación.....21

Índice de tablas

- **Tabla 1.-** Características agronómicas de los patrones seleccionados..... 12
- **Tabla 2.-** Condiciones de reacción para qPCR14
- **Tabla 3.-** Concentración y volumen de los componentes de la mezcla de reacción de qPCR 15

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1.Contexto.

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera*) tiene su origen en Asia. Es uno de los cultivos más importantes debido a su gran superficie cultivada y al gran valor económico que alcanza (Bouquet y col., 2006). En España existen unas 957.573 has plantadas de vid que generan en mano de obra, unos 18 millones de jornales aproximadamente (MAPA, 2019).

En las últimas décadas, se ha producido un declive de la superficie destinada al cultivo de la vid, tal y como se observa en la *Figura 1*, sin embargo, España sigue siendo un gran productor de vino, ocupando el segundo lugar por debajo de Italia. En la actualidad el potencial vitícola de España es de 1.045.427 ha incluyendo: la superficie plantada de viñedo, los derechos de plantación de viñedo y los derechos de las reservas regionales (MAPA, 2019).

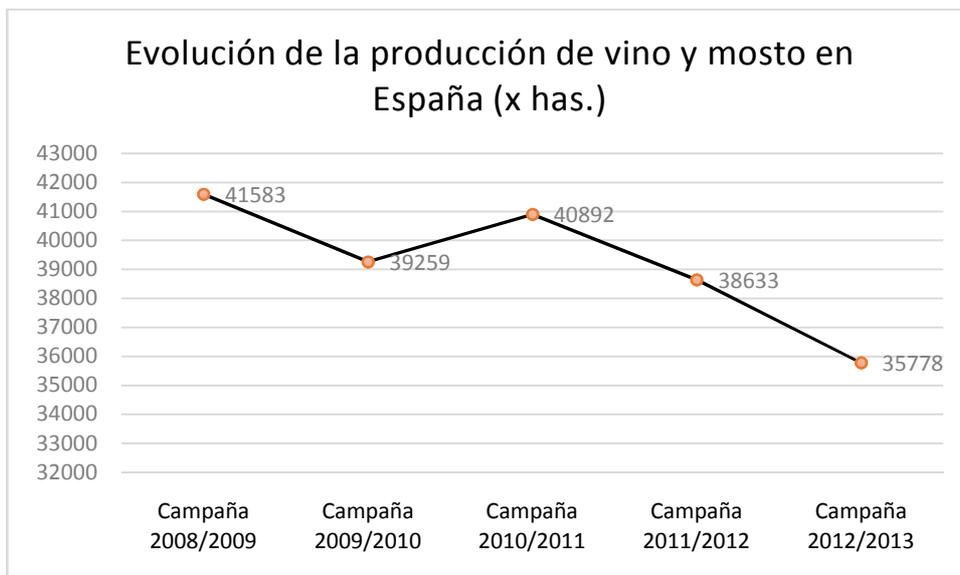


Figura 1.- Evolución de la superficie de hectáreas plantadas de viñedo en España desde la campaña 2008/2009 hasta la campaña 2012/2013 (Fuente: MAPA, 2019).

Las variedades tintas representan un 54% del total de la superficie de viñedo en nuestro país, alcanzando una media de 550.679 has. Por otra parte, las variedades blancas alcanzan una media de 467.128 has en las campañas desde el año 2008 hasta el 2013 (MAPA, 2019). Castilla la Mancha es la comunidad autónoma que más kilos de uva totales produce alcanzando el 50% de la producción total de nuestro país, seguido de Extremadura, tal y como se muestra en la *Figura 2*.

CCAA	ENTRADA DE UVA (kg)			VINO		TOTAL VINO
	TINTA	BLANCA	TOTAL	TINTO/ROSADO	BLANCO	
ANDALUCIA	7.382.625	163.111.455	170.494.080	55.504	1.187.787	1.243.291
ARAGON	161.676.180	23.234.898	184.911.078	1.272.033	171.130	1.443.163
ASTURIAS	-	-	-	-	-	-
BALEARES	3.735.996	2.380.115	6.116.111	27.799	16.379	44.178
CANARIAS	2.075.169	4.356.001	6.431.170	14.456	31.889	46.345
CANTABRIA	-	-	-	-	-	-
CASTILLA LA MANCHA	1.397.419.799	2.342.299.051	3.739.718.850	10.899.224	13.727.328	24.626.552
CASTILLA Y LEON	174.032.214	138.379.474	312.411.688	1.263.156	1.001.928	2.265.084
CATALUÑA	95.058.528	327.871.046	422.929.574	751.524	2.500.595	3.252.119
EXTREMADURA	136.650.394	359.490.274	496.140.668	1.158.341	2.465.664	3.624.005
GALICIA	8.008.966	44.187.919	52.196.885	54.436	323.710	378.146
MADRID	8.761.583	6.095.307	14.856.890	67.471	42.299	109.770
MURCIA	113.981.527	5.604.018	119.585.545	837.645	36.140	873.785
NAVARRA	95.773.746	13.199.850	108.973.596	739.401	94.317	833.718
PAIS VASCO	89.936.404	14.507.533	104.443.937	673.001	93.347	766.348
LA RIOJA	294.267.938	42.904.979	337.172.917	2.213.945	210.384	2.424.329
C. VALENCIANA	236.540.058	94.673.040	331.213.098	1.642.698	615.070	2.257.768
TOTAL	2.825.301.127	3.582.294.960	6.407.596.087	21.670.634	22.517.967	44.188.601

Figura 2.- Entrada de uva y producción de vino de productores ≥ 1.000 hl por ccaa y color de 1 de agosto a 31 de mayo 2019 (hl). (Fuente: MAPA, 2019)

La producción de vino y mosto en nuestro país se caracteriza por una gran variabilidad entre campañas, debido a que se trata de uno de los cultivos más dependientes de las condiciones climatológicas. A su vez, este cultivo es muy sensible al ataque de diferentes enfermedades de origen fúngico, entre las que se encuentran el oidio (*Uncinula necator*), mildiu (*Plasmopara viticola*) y la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) (Carrero y Planes, 2008).

El sector vitivinícola se encuentra en alerta debido a la pérdida progresiva de superficie cultivada de vid como consecuencia de las dificultades tanto para conservar como para establecer plantaciones nuevas. Estas dificultades se deben en gran medida a la creciente problemática de los hongos de madera (Agustí-Brisach y col., 2017). *Vitis vinifera* es conocida por albergar la más amplia variedad de patógenos que cualquier planta agrícola leñosa, entre ellos los hongos patógenos asociados a las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EFMV) (Gramaje y col., 2018).

Destacar que en España solo 34 variedades representan el 95% de la producción total, esto es debido a que la administración restringe el cultivo de variedades a las diferentes denominaciones de origen. La sensibilidad de estas pocas variedades a los ataques de patógenos, supone grandes pérdidas tanto de producción como de calidad. A todo esto, tenemos que sumar el uso excesivo de productos fitosanitarios que ha llevado a la Directiva Europea 2009/128/CE a restringir en gran medida la utilización de este tipo de productos, lo cual ha provocado la búsqueda de sistemas alternativos con técnicas de producción sostenibles como el uso de variedades resistentes a los hongos.

Actualmente existe un desarrollo de nuevas variedades resistentes a hongos, diseñadas para eliminar los efectos de las principales enfermedades fúngicas utilizando en la menor medida posible productos fungicidas (Montaigne y col., 2016). Para introducir una variedad resistente, se deben hacer múltiples cruces repetitivos de la variedad noble con la variedad resistente y, además, estas nuevas plantas, deben de tener una aceptación agronómica en el campo como enológica por la sociedad.

I.2. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid.

En España, las EFMV más importantes son: la yesca en planta adulta; y la enfermedad de Petri, el pie negro y el decaimiento por *Botryosphaeria* en plantaciones jóvenes (Gramaje y Armengol, 2011; Agustí-Brisach y Armengol, 2013). Los principales motivos por los que en la actualidad se considera a las EFMV como una gran amenaza para el cultivo son: la gran diversidad de hongos patógenos asociados a las mismas, con presencia de infecciones conjuntas en las plantas; el escaso conocimiento de su epidemiología; y la falta de medidas eficaces de control (Armengol, 2017).

I.2.1. Principales enfermedades y su sintomatología.

Estas enfermedades afectan tanto a plantaciones adultas (más de ocho años) como a plantaciones jóvenes (menos de ocho años) y se caracterizan por presentar todas ellas un síntoma común que consiste en una alteración interna de la madera de la planta ya sea por necrosis o por podredumbre seca (MAGRAMA, 2014). En consecuencia, la planta muestra un menor vigor y desarrollo, ausencia o retraso de la brotación, acortamiento de entrenudos, clorosis y/o marchitez en hojas, provocando un decaimiento general de la planta que puede causar la muerte de la misma (Agustí-Brisach y col., 2014).

Las EFMV son causadas principalmente por hongos Ascomicetos, pero algunos Basidiomicetos también pueden desempeñar un papel importante en este complejo de enfermedades (Cloete y col., 2015; Fischer 2002):

- La yesca. Esta enfermedad se puede presentar bajo dos formas: lenta y rápida o apopléjica. En la primera, las hojas muestran en las zonas internerviales una coloración amarilla u roja, dependiendo de la variedad, que posteriormente evoluciona a necrosis. En la forma apopléjica se produce la muerte repentina de la planta, generalmente en los meses de verano (MAGRAMA, 2014). Las secciones transversales de los troncos afectados también revelan una gran variedad de síntomas internos en la madera, como puntos negros en el xilema, vetas vasculares negras o madera seca con apariencia plateada (Gramaje y col., 2018). Los hongos principales responsables de la enfermedad aún son inciertos. Se cree que las vides jóvenes son infectadas por hongos del género *Phaeoacremonium* como *Pm. minimum* y/o *Pa. chlamydospora*. La Yesca también puede tener origen en plantas maduras por hongos Basidiomicetos pertenecientes a los géneros *Inocutis*, *Inonotus*, *Fomitiporella*, *Fomitiporia*, *Phellinus* y *Stereum* (Cloete y col., 2015).
- Decaimiento por *Botryosphaeria*. Causado por especies de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryosphaeria* y *Spencermartinsia*. (Pitt y col., 2013; Rolshausen y col., 2013; Urbez-Torres, 2011; Yang y col., 2017). El decaimiento por *Botryosphaeria* se presenta como una falta de crecimiento primaveral en las ramas afectadas, con una muerte del brote y una necrosis tanto de la yema como del Xilema (Urbez-Torres, 2011). El principal síntoma de esta enfermedad es la aparición de chancros perennes en forma de cuña. A

diferencia de la muerte por *Eutypa*, en esta enfermedad el sistema foliar permanece asintomático (Gramaje y col., 2018).



Figura 3.- Sintomatología en madera de la Yesca y de la Muerte por *Botryosphaeria*. (A) La madera de vid es afectada por Yesca, muestra manchas negras, vetas vasculares, decoloración, necrosis, y especialmente en vides de más de 8 años, también puede mostrar descomposición esponjosa blanca. (B) La madera de las plantas infectadas por *Botryosphaeria* muestra la presencia de sectores necróticos marrones, típicamente en forma de arco y sectoriales, en forma de cuña con necrosis (Fuente: Mondello y col., 2018).

- La enfermedad de Petri es frecuente en plantas jóvenes, apareciendo sus síntomas pocos años tras la plantación (García-Jiménez y col., 2010). Los agentes causales son *Pa. chlamydospora*, 29 especies de *Phaeoacremonium*, *Pleurostomofora richardsiae* y seis especies de *Cadophora* (Gramaje y col., 2018). Estos hongos están considerados como hongos de suelo, pudiendo infectar a las plantas a través de heridas en raíces o en la parte basal que está en contacto con el suelo (Agustí-Brisach et al., 2011). Además, también pueden infectar de forma aérea a través de la infección de las heridas de poda (Agustí-Brisach y col., 2015). Esta enfermedad afecta a la parte basal del patrón de plantas jóvenes, colonizando los tejidos xilemáticos. En cortes transversales se observan pequeñas punteaduras necróticas formando un anillo alrededor de la medula que en ocasiones produce una exudación gomosa (MAGRAMA, 2014).
- Los agentes causales del Pie negro pertenecen a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* y *Thelonectria* (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). Estos hongos infectan las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo (MAGRAMA, 2014). Los síntomas de esta enfermedad afectan al sistema radical y a la base del patrón de plantas jóvenes, provocando lesiones necróticas que resultan en una reducción de la masa radicular que se traduce en una necrosis generalizada (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). La eliminación de la corteza revela una decoloración negra la cual da lugar al nombre de esta enfermedad.

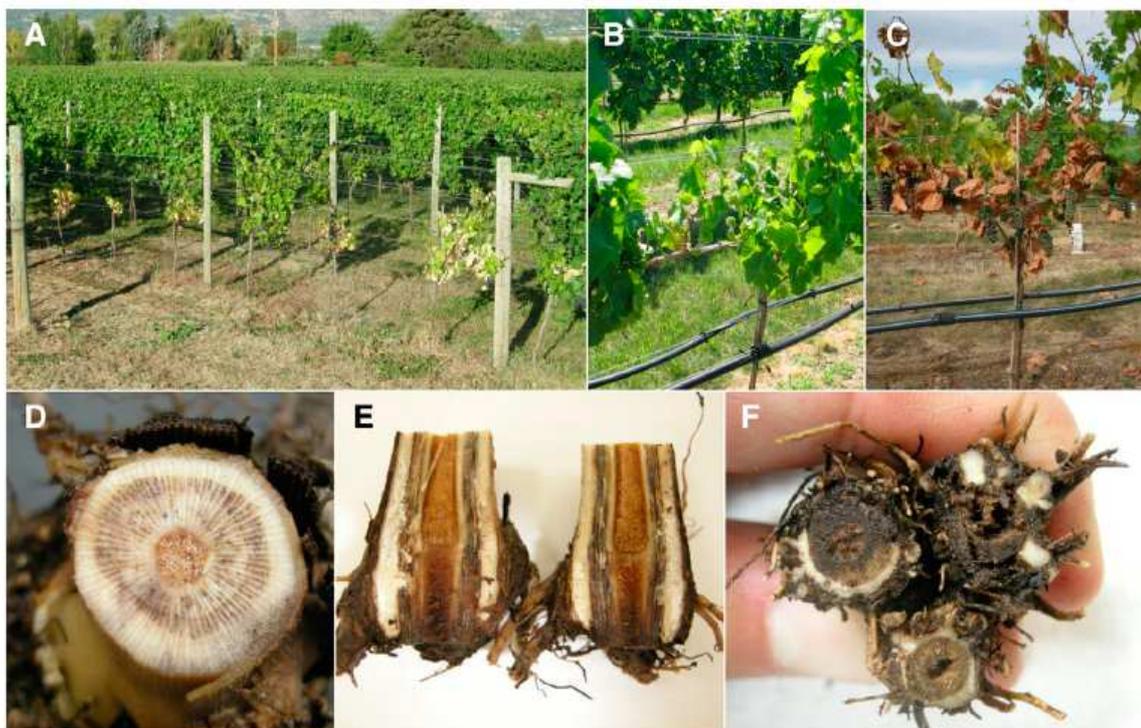


Figura 4.- Enfermedad de Petri y síntomas foliares y vasculares del pie negro. (A) Vides de escaso vigor que muestran hojas cloróticas afectadas por la enfermedad de Petri. (B) Vid afectada por el pie negro que muestra retraso del crecimiento general con entrenudos de brotes cortos. (C) El marchitamiento repentino de las hojas y los brotes es un síntoma característico de la enfermedad de Petri o de plantas infectadas del pie negro y (D) sección longitudinal. (E) Muestra vasos de xilema oscuros y vetas necróticas infectadas por hongos de la enfermedad de Petri. (F) Necrosis de madera en el extremo basal del portainjerto en pie negro de vides infectada (Fuente: Gramaje y col., 2015).

I.2.2. Problemática.

Las EFMV se encuentran entre las patologías más dañinas que afectan al cultivo de la vid. Tradicionalmente, estas enfermedades se han asociado a viña adulta. La yesca y la eutipiosis eran muy conocidas por los viticultores y su control se realizaba principalmente mediante la aplicación de arsenito sódico y podas sanitarias para eliminar madera muerta. Sin embargo, a partir de la década de 1990, coincidiendo con el establecimiento de numerosas plantaciones nuevas, se comenzó a detectar en diferentes regiones del mundo, incluida España, un aumento en el decaimiento y muerte progresiva de plantas jóvenes ya desde el primer año de la plantación. Este fenómeno también se observó durante el proceso de producción de planta injertada en los viveros. Esta situación provocó un interés en el estudio de estas enfermedades, impulsando el desarrollo de nuevas líneas de investigación en todo el mundo (Gramaje y Armengol, 2011; Bertsch y col., 2012).

Diversos investigadores han sugerido que este incremento en la incidencia de las EFMV puede relacionarse con varios factores. En primer lugar, con una reducción en el cuidado sanitario del material de propagación, con lo cual se vio disminuida la

calidad de las plantas de vivero. En segundo lugar, con los cambios ocurridos en las prácticas culturales y manejo del viñedo siendo quizás uno de las más relevantes la escasa protección de las heridas de poda en el campo ya desde el momento de la plantación, que pueden favorecer la entrada de diferentes patógenos. Y, finalmente, la prohibición del uso del arsenito de sodio que fue reemplazado por otros fungicidas menos eficaces (Luque y col., 2014). Según estimaciones recientes, el coste anual del replante de vid en el mundo debido a las EFMV asciende a 1.132 billones de euros (Hofstetter y col., 2012).

El control de las EFMV es uno de los grandes desafíos de los viticultores en la actualidad puesto que este tipo de enfermedades presentan un estado de latencia indeterminado (estado asintomático). Cuando los primeros síntomas foliares aparecen, la madera puede estar gravemente afectada, dando pocas oportunidades a los viticultores de poder reducir las consecuencias de estas enfermedades (Mondello y col., 2018).

I.2.3. Manejo de las EFMV.

La gestión de estas enfermedades debe ser holística e integrada, con un enfoque interdisciplinario realizado en viveros y viñedos que integran patología vegetal, agronomía, viticultura, microbiología, epidemiología, bioquímica, fisiología y genética (Gramaje y col., 2018).

En los últimos años se ha destacado el papel que el material vegetal producido en viveros puede tener sobre la incidencia y diseminación de estos patógenos, y la prevalencia de las enfermedades. Desafortunadamente, en la actualidad no existen medidas de control curativas, por lo que es de suma importancia la utilización de planta libre de estos patógenos para el establecimiento de nuevas plantaciones. La aplicación de fungicidas o agentes de control biológico, principalmente en las fases de hidratación y de inducción del callo, y/o durante la fase de enraizamiento en campo, ha mostrado resultados variables. Además, la actual Normativa fitosanitaria sobre la comercialización de los productos fitosanitarios (Directiva 91/414/CEE) limita de forma sustancial la aplicación de productos registrados en el cultivo de la vid. Muchos estudios se han centrado en la evaluación de tratamientos por termoterapia con agua caliente, entendiéndose esta técnica como una alternativa con gran potencial para el control de hongos de la madera y otros patógenos en el proceso de producción de planta injertada, por consiguiente, es indispensable seguir con la búsqueda de alternativas de control que permitan mejorar la calidad fitosanitaria del material de plantación. En este sentido, la selección y/o desarrollo de portainjertos y variedades con niveles mejorados de resistencia a la infección por hongos de la madera aparece como una estrategia de manejo de las EFMV en vides jóvenes (Gramaje y col., 2014), que podría permitir una reducción en la extensión del crecimiento de los patógenos en ellos y de su impacto negativo sobre el desarrollo de la combinación portainjerto/variedad (Gramaje y Armengol, 2011). Además de la selección de portainjertos resistentes, en la actualidad también se procura minimizar las infecciones en suelos de viveros, ya que son una de las principales fuentes de inóculo para patógenos transmitidos por el suelo (pie negro). Algunas de estas medidas son la fumigación o solarización, para eliminar a hongos patógenos (Gramaje y col., 2018).

Es imprescindible que el material con el que se comience la siembra sea de la mejor calidad fitosanitaria posible. Actualmente, existen metodologías que

proporcionan una vid libre de virus, sin embargo, no se ha conseguido obtener materiales libres de hongos patógenos en madera (Gramaje y col., 2018). De entre los patógenos fúngicos asociados a las EFMV, dos de los más importantes son *Pa. Chlamydospora* y *Pm. minimum*, ya que se tratan de hongos presentes tanto en plantas jóvenes (enfermedad de Petri) como en plantas adultas (Yesca).

Pm minimum es el patógeno que se estudia en este trabajo, por tanto, este hongo patógeno se describe a continuación con más detalle.

I.2.4. *Phaeoacremonium minimum*.

Dentro del género *Phaeoacremonium* existen 46 especies, mientras que en su forma sexual, llamada *Togninia*, se encuentran 26 epítetos (Gramaje y col., 2015). Las cepas de vid en las que están presentes las diferentes especies del género *Phaeoacremonium* presentan una sintomatología característica como es la obstrucción de los haces vasculares en la enfermedad de Petri y Yesca de la vid (Nigro y col, 2013).

Todas las especies del género *Phaeoacremonium* se encuentran en el medio ambiente, como agentes de enfermedad en diversas plantas leñosas. Una distribución de las especies aisladas en ambientes agrícolas publicada por Mostert y col. en 2006 muestra cómo hasta 42 especies de *Phaeoacremonium* han sido aisladas en madera, incluyendo a *Pm. minimum*.

Tal y como se muestra en la Figura 5 descrita por Gramaje y col. en 2015, el micelio de este hongo consiste en hifas ramificadas, septadas, simples o agrupadas de un color medio marrón y de aspecto liso o verrugoso. Puede haber conidióforos ramificados en la sección basal o no ramificada y recta. En ambos casos el color es marrón pálido a hialino con un discreto collarín en forma de embudo. Los conidios que se encuentran agregados suelen tener un aspecto viscoso y, hacia los ápices, se diferencian células septadas o lisas (Gramaje y col., 2015).

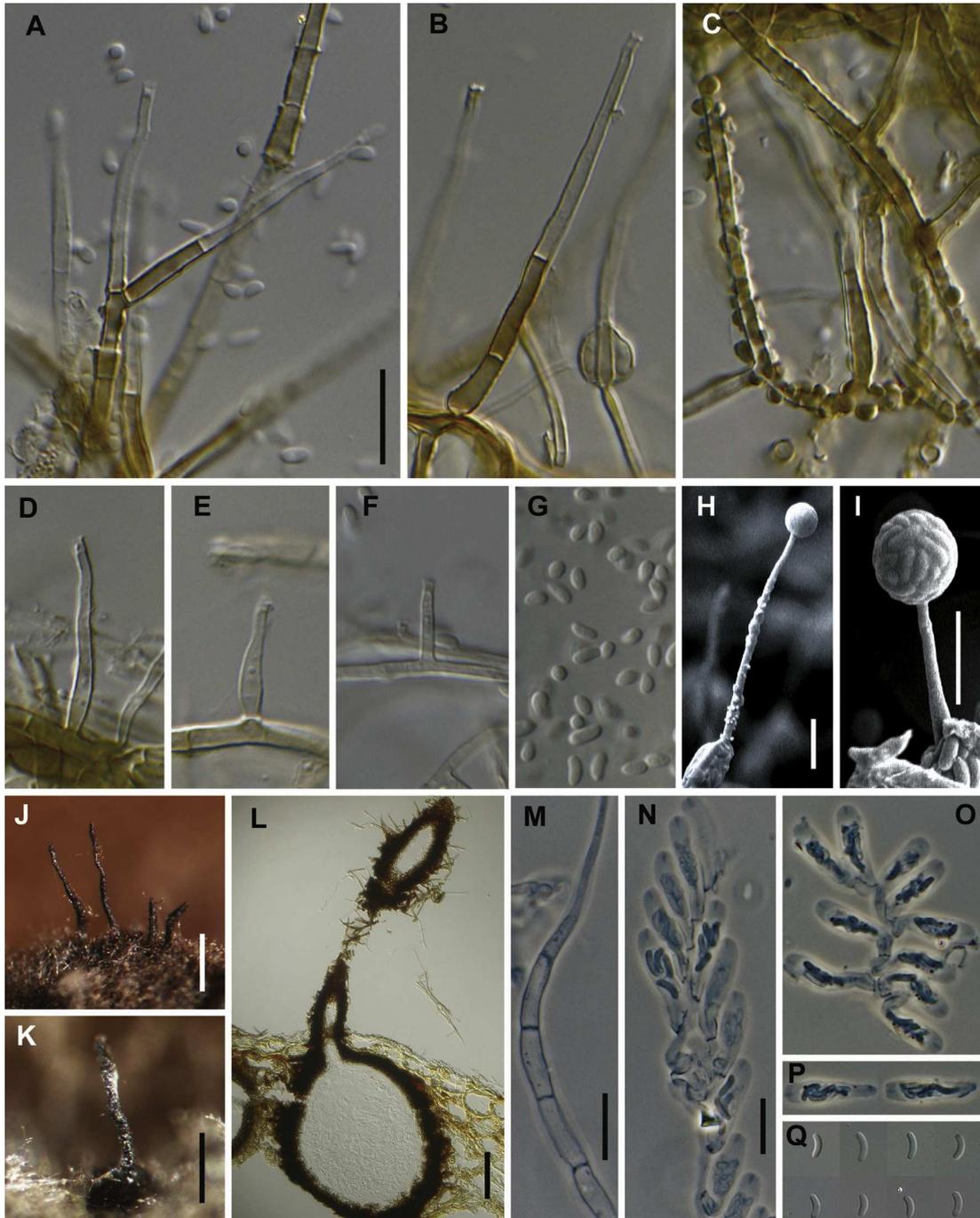


Figura 5.- Estructura ramificada de las hifas y diferentes morfologías de los conidios de *Pm. minimum* producidos en ellos, junto a peritecios de la forma sexual y ascosporas. Fuente: (Gramaje y col., 2015).

Pm. minimum presenta un telomorfo (etapa reproductiva sexual como hongo ascomiceto) tipo *Togninia*, el cual presenta un ascocarpo (peritecio) de pared gruesa y negra con textura verrugosa, pero con la parte apical ligeramente más pálida, compuesto por hifas esbeltas y no curvadas. Las ascosporas se encuentran libres en el interior del ascocarpo, que se abrirá para permitir la dispersión de las células reproductivas del hongo (ascosporas) (Figura 5).

La epidemiología de este hongo ha sido estudiada más en detalle dentro de la vid que en otros cultivos. Puesto que el ciclo de vida de *Pm. minimum* es más común y está ampliamente distribuido dentro de la vid (Gramaje y col., 2015). *Phaeoacremonium minimum* reside en el xilema y en la medula de las plantas de vid como un agente endófito, produciendo libremente conidios que son transportados a través de la savia (Feliciano y Gubler, 2001). El hongo tiene la capacidad de moverse, germinar y penetrar a través de las paredes celulares del parénquima vascular causando necrosis tisular. La vid responde a la presencia de *Pm. minimum* produciendo gomas dentro del xilema que ayudan a compartimentar y restringir el movimiento y crecimiento del patógeno (Mugnai et al. 1999).

Además, este hongo es capaz de pasar el invierno dentro de tejidos viejos, en los haces vasculares de los residuos de poda, en grietas profundas o en troncos. Por otra parte, puede llegar a ser transmitido por el suelo o por agua estancada bajo las vides. Estudios de patogenicidad utilizando suelos inoculados artificialmente demostraron que *Phaeoacremonium spp.* puede infectar y colonizar raíces de vid (Gramaje y col., 2015).

En primavera, cuando las temperaturas del aire y del suelo aumentan, el crecimiento de la vid se vuelve vigoroso y el hongo reanuda su actividad. *Pm. minimum* produce conidios y ascosporas que se propagan por agua, viento y/o insectos (Moyo y col., 2014).

La formación de peritecios de *Pm. minimum* sobre madera de vid indica que la forma sexual podría formarse fácilmente en el campo bajo las condiciones ambientales adecuadas. Estos peritecios, se liberan después de los periodos de lluvia o riego por aspersion e infectan la vid a través de heridas de poda. En el ciclo de vida de *Pm. minimum* representado en la Figura 6, los conidios también pueden ser dispersados por el aire o incluso por artrópodos. Varios estudios han demostrado que los conidios de *Pm. minimum* pueden infectar fácilmente las heridas de poda y que las heridas de poda son particularmente vulnerables a la colonización (Gramaje y col., 2015). Edwards y col. (2001) sugirieron que los colémbolos y ácaros podrían llevar esporas adheridas a su cuerpo y de esta forma convertirse en otro medio de propagación, ya que se encontró evidencia de este tipo de dispersión en el aislamiento de la especie *Pm. scolytia* partir de larvas de insectos, así como el aislamiento de *Pm. minimum* en larvas dentro de las galerías de los árboles.

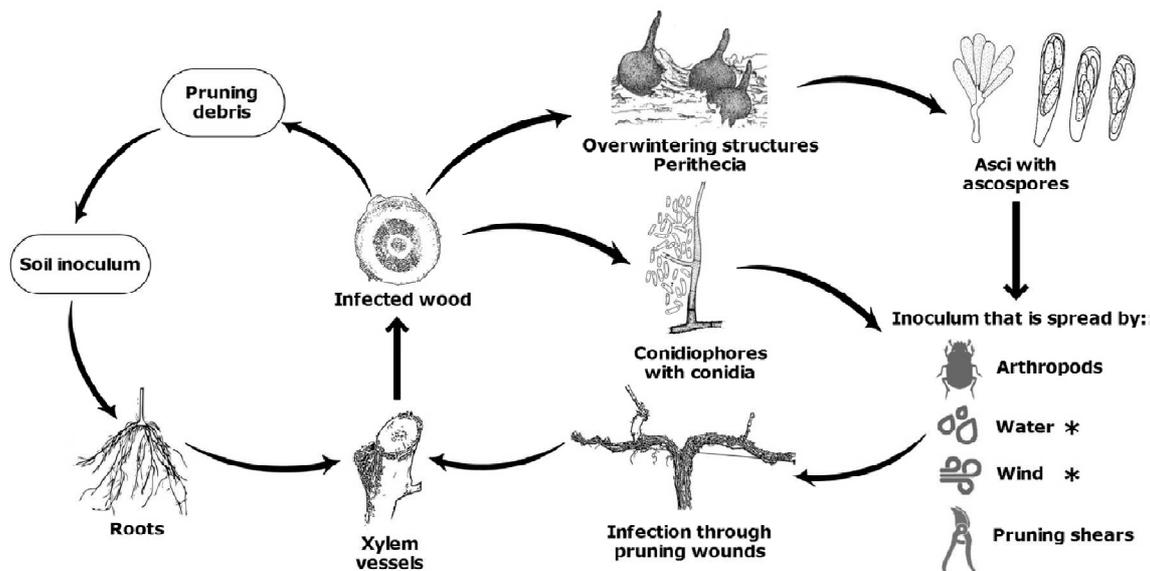


Figura 6.- Ciclo de vida de *Pm. minimum* causando enfermedades de la madera de la vid. Los asteriscos indican las principales formas de diseminación del inóculo. Fuente: (Gramaje y col., 2015).

I.3. Técnicas moleculares para la detección de EFMV.

Tradicionalmente, la detección e identificación de patógenos asociados a las EFMV consiste en la toma de muestras de tejidos para su posterior siembra en placas Petri con medio de cultivo. El siguiente paso es esperar a que le hongo crezca (varios días) para poder ser observado y estudiado. Este proceso de identificación es lento y difícil ya que requiere de amplia experiencia. Además, la identificación se dificulta ya que varias especies de hongos pueden estar presente en una sola muestra de madera (Gramaje y Armengol, 2011). Por estas razones, hay una creciente demanda de técnicas moleculares para la detección de estos patógenos en diagnóstico de enfermedades de plantas (Gramaje y Armengol, 2011).

Entre todas las técnicas moleculares disponibles, se han descrito algunos métodos de PCR a tiempo real o qPCR (“Quantitative PCR”) para la detección y cuantificación de algunos de los patógenos asociados a las EFMV. Por ejemplo, Pouzoulet y col. diseñaron en 2013 cebadores específicos en el gen de la beta tubulina para la detección en planta de *Pa. chlamydospora* y *Pm. minimum* mediante qPCR.

La qPCR combina la amplificación de la PCR convencional con la detección a tiempo real mediante el uso de marcadores fluorescentes que además permite la cuantificación del ADN del patógeno a partir de una curva estándar (Huanget *al.*, 2016).

El ADN amplificado se detecta cuando el producto de PCR alcanza un valor de intensidad de fluorescencia por encima del ciclo umbral o “cyclethreshold” (Ct), considerado el ciclo a partir del cual, el incremento de fluorescencia respecto al fondo es estadísticamente significativo (Biocompare, 2017).

II.Objetivos

II. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la sensibilidad de una colección de portainjertos de vid a la infección por el hongo *Phaeoacremonium minimum* utilizando técnicas microbiológicas basadas en el aislamiento en medio de cultivo y técnicas moleculares basadas en la detección y cuantificación específica del patógeno mediante qPCR.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de un total de 26 patrones de viña proporcionados por la colección de la Finca El Encín del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA) de Alcalá de Henares, Madrid, seleccionados por diferentes características agronómicas (Tabla 1).

Variedad	Parentales	Caliza activa (resiste)	Exceso humedad suelo	Resiste Sequía	Nemátodos (resistencia)	Salinidad (tolerancia hasta)	Maduración
CASTEL 7605	<i>V. riparia</i> x <i>V. berlandieri</i>						
COURDEC 404	<i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i>						
COURDEL 1202	<i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i>						
MILLARDET 145	<i>V. vinifera</i> x (Cordifolia-Rupestris Grasset)						
CASTEL 16971	(Vinifera x Rupestris) x Riparia	0,14	Tolerante	Resistente	Poco	1g/l	
MILLARDET-GRASSET 420A	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	0,2	Tolerante	Muy poco	Poco	0,4g/l	Adelanta
OBERLIN 595	<i>V. riparia</i> x <i>V. vinifera</i>						
BLANCHARD 1	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. vinifera</i>						
RIPARIA GRAND GLABRE	<i>V. riparia</i>						
RUPESTRIS FORT WORTH 1	<i>V. rupestris</i>						
ESCUELLA MONTPELLIER 333	<i>V. vinifera</i> x <i>V. verlandieri</i>	0,4	Tolera bien	Alta	Poco	0,5g/l	
FOEX 34-E	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>						
RUGGIERI 343	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>						
GREZOT G1	(<i>Solinis</i> x <i>V. riparia</i>) x <i>V. rupestris</i>						
EVEX JEREZ 13-5	<i>Vitis berlandieri</i>	0,35		Media	Media		Adelanta
CASTELL 6971	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>						
COURDEC 1616	<i>Solinis</i> x <i>V. riparia</i>	0,1	Alta tolerancia	Media	Resistente	1,2g/l	
BERLANDIERI RESSEGUIER 1	<i>V. berlandieri</i>						
COURDEC 3309	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>	0,11	Sensible	Poco	Poco	0,4g/l	Adelanta
CASTEL 6736	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>	0,13	Sensible	Alta	Insuficiente	0,5g/l	

Tabla 1.- Características agronómicas de los patrones seleccionados.

Un total de 9 fragmentos de 10 cm de los diferentes materiales, lo que denominaremos plantas, se inocularon en un ensayo previo con una suspensión de 10^6 esporas de *Pm. minimum* en un sistema de cultivo hidropónico tal como se muestra en la Figura 7. A los 15, 30 y 45 días después de la inoculación se tomaron 3 fragmentos de 1 cm de longitud de cada uno de los materiales. Estos fragmentos se dividieron longitudinalmente para la detección del patógeno utilizando:

- Técnicas microbiológicas basadas en el aislamiento de *Pm. minimum* en medio de cultivo.
- Técnicas moleculares basadas en la detección y cuantificación específica de *Pm. minimum* mediante PCR cuantitativa (para este análisis se utilizaron solamente los fragmentos tomados 45 días después de la inoculación).

	
<p>Fragmentos de 10 cm de los diferentes materiales estudiados que identificamos como plantas</p>	<p>Colocacion de los fragmentos (plantas) en la lámina de espuma</p>
	
<p>Fragmentos (plantas) en contacto con la suspensión de conidios</p>	<p>Fragmentos (plantas) mantenidos en la solución de Hoagland en cultivo hidropónico en condiciones ambientales controladas</p>

Figura 7.- Proceso de inoculación de patrones con el patógeno *Pm. minimum*.

III.1. Aislamiento en medio de cultivo.

Para el aislamiento de *Pm. minimum* se utilizó la mitad de cada uno de los 3 fragmentos de madera de 1 cm de longitud que, como se ha indicado anteriormente, se obtuvieron de cada uno de los materiales a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación.

Los fragmentos se desinfectaron externamente sumergiéndolos durante 3 segundos en alcohol de 96 ° y flameando. En cada uno de los fragmentos obtenidos de cada muestra se seleccionaron 7 pequeñas porciones (2-4 mm) de madera. Estas porciones se sembraron en placas Petri con medio de cultivo agar extracto de malta a las que se había añadido sulfato de estreptomycin (MEAS) (20 g de extracto de malta; 15 g de agar; 0,5 g de sulfato de estreptomycin; 1 litro de agua destilada).

Las placas así sembradas se incubaron en estufa a 25°C en oscuridad durante 15 días. De las colonias crecidas se extrajeron puntas hifales en las zonas de borde, que se repicaron a medio patata-dextrosa-agar (PDA) (39 g de patata-dextrosa-agar; 1 litro de agua destilada), para su posterior identificación. Las colonias ya repicadas se dejaron a 25°C en oscuridad durante 10-15 días. Tras la incubación, se procedió a realizar una identificación morfológica de las colonias fúngicas crecidas en el medio PDA. Ésta se basaba en observar el aspecto morfológico de las colonias (color, tipo y abundancia de micelio, etc.) y en realizar preparaciones al microscopio para la identificación morfológica de las estructuras y esporulación características de *Pm. minimum*.

Se calculó el porcentaje de incidencia acumulado para cada material a los 15, 30 y 45 días tras la inoculación considerándose una planta infectada si al menos se conseguía un punto de aislamiento positivo para *Pm. minimum*.

III.2. PCR cuantitativa.

III.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo según la metodología descrita por Saito y col. en 2013 basado en el uso de un tampón de extracción con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Para ello se usó la mitad restante del cada uno de los 3 fragmentos de madera de los diferentes materiales obtenidos tras 45 días desde la inoculación, se homogeneizó previamente a la extracción con ayuda de una maza y mortero. Aproximadamente 40 mg del material homogeneizado se introdujo en un tubo de 2 ml junto con el buffer de extracción CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M y PVP (Poli-vinil pyrrolidona al 1%). La rotura celular se llevó a cabo con un equipo FastPrep-24™5G (MP Biomedicals, California, USA) en el que se introdujeron los tubos con las muestras, el tampón y 2 bolas de acero de 3,3 mm diámetro. Se utilizaron 2 tandas de 5 m/s por 20 segundos. A continuación, las muestras se incubaron durante al menos 15 minutos a 65 °C. Tras este paso fue necesario enfriar las muestras hasta temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 500µl de una solución de Cloroformo alcohol isoamilico (24:1, v:v adecuada para la purificación de ácidos nucleicos). Tras la mezcla con un vórtex los tubos se centrifugaron durante 5 min a 12.000 r.p.m. Se recogieron 600 µl del sobrenadante resultante a un tubo Eppendorf y se añadieron otros 500 µl de Cloroformo alcohol isoamilico repitiendo este último paso dos veces.

Para la eliminación de las proteínas en la solución, se añadieron 500 µl de Cloroformo-Isoamil Alcohol (24:1, v:v). Nuevamente se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 12.000 r.p.m. y al sobrenadante se añadió el mismo volumen de Isopropanol frío y 1/3 del volumen de Acetato de sodio 3 M. Tras una centrifugación de 5 minutos a 12.000 r.p.m. a una temperatura de 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet varias veces con EtOH a 4 °C teniendo especial cuidado con no eliminar el pellet que contenía el DNA extraído de las muestras de madera. El ADN se secó a temperatura ambiente durante 24 h y finalmente se disolvió en 100 µl para su posterior conservación a -20 °C hasta su posterior análisis.

III.2.2 Detección mediante qPCR

III.2.2.1 Preparación de diluciones de ADN (estándar de concentración)

Se prepararon 10 diluciones seriadas 1:10 a partir del producto de extracción de ADN de un cultivo puro de un aislado representativo y bien caracterizado de *Pm. minimum* obtenido de la colección de hongos del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV).

Partiendo de estas diluciones, se realizó la curva de calibrado para la cuantificación de la concentración del ADN del patógeno en las muestras siguiendo las condiciones de reacción que se describirán posteriormente. Se calculó el límite de detección (LD) entendido como la mínima concentración del patógeno que la técnica es capaz de detectar en todas las repeticiones. De esta forma se establece un umbral que determina si una muestra da positivo o negativo para *Pm. minimum*.

III.2.2.2. Reactivos y condiciones de reacción

Para la qPCR se utilizaron los cebadores específicos para *Pm. minimum* descritos por Pouzoulet y col. en 2013.

Se utilizó un volumen de reacción total de 25 μ l incluyendo 12,5 μ l de premix 1 X (TaKaRa Ex Taq HS DNA Polymerase, dNTP mixture, Mg²⁺, TliRNaseH, y SYBR Green I), los cebadores específicos PalQF y PalQR a una concentración final de 0,3 μ M (0,75 μ l de cada cebador) y 2 μ l del ADN de cada muestra. Para cada reacción se incluyó un control negativo sin ADN y el análisis se repitió 4 veces.

Componente	Concentración final	Volumen
SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (1x)	1 μ M	12,5 μ l
Primer directo - PalQF (μ M)	0,3 μ M	0,75 μ l
Primer reverso - PalQR (μ M)	0,3 μ M	0,75 μ l
H ₂ O		9 μ l

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

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) bajo las condiciones: (A) desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, (B) 40 ciclos de desnaturalización durante 5 s a 95 °C seguidos de alineamiento durante 35 s a 65 °C

Además, se llevó a cabo un análisis de “melting” en cada reacción para determinar la temperatura de fusión de los productos obtenidos, comprobando así la especificidad de la reacción.

Fase		Condiciones
Desnaturalización inicial		95°C 5 min
Amplificación 40 ciclos	Desnaturalización Hibridación	95°C 5 s 65°C 35 s
“Melting” (curvas de fusión)		60°C-95°C

Tabla 3.- Condiciones de reacción para qPCR.

III.3. Análisis estadístico

Se calculó la concentración promedio de ADN de *Pm. minimum* en cada uno de los materiales estudiados y se evaluó si existían diferencias significativas entre ellos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. También se llevó a cabo un test LSD de separación de medias con un nivel de significación de $P < 0,05$.

IV.Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se ha puesto a punto la metodología de cuantificación de *Pm. minimum* basada en qPCR descrita por Pouzolet y col. en 2013. Se obtuvo una curva estándar con un coeficiente de determinación de 0,99872 y una eficiencia de reacción de 1,2. La concentración mínima del patógeno detectable en todas las repeticiones (LD) fue de 50 fg/μl. Pouzolet y col. obtuvieron un LD del patógeno en plantas inoculadas de 250 fg/μl con una eficiencia de reacción de 1 (Figura 8).

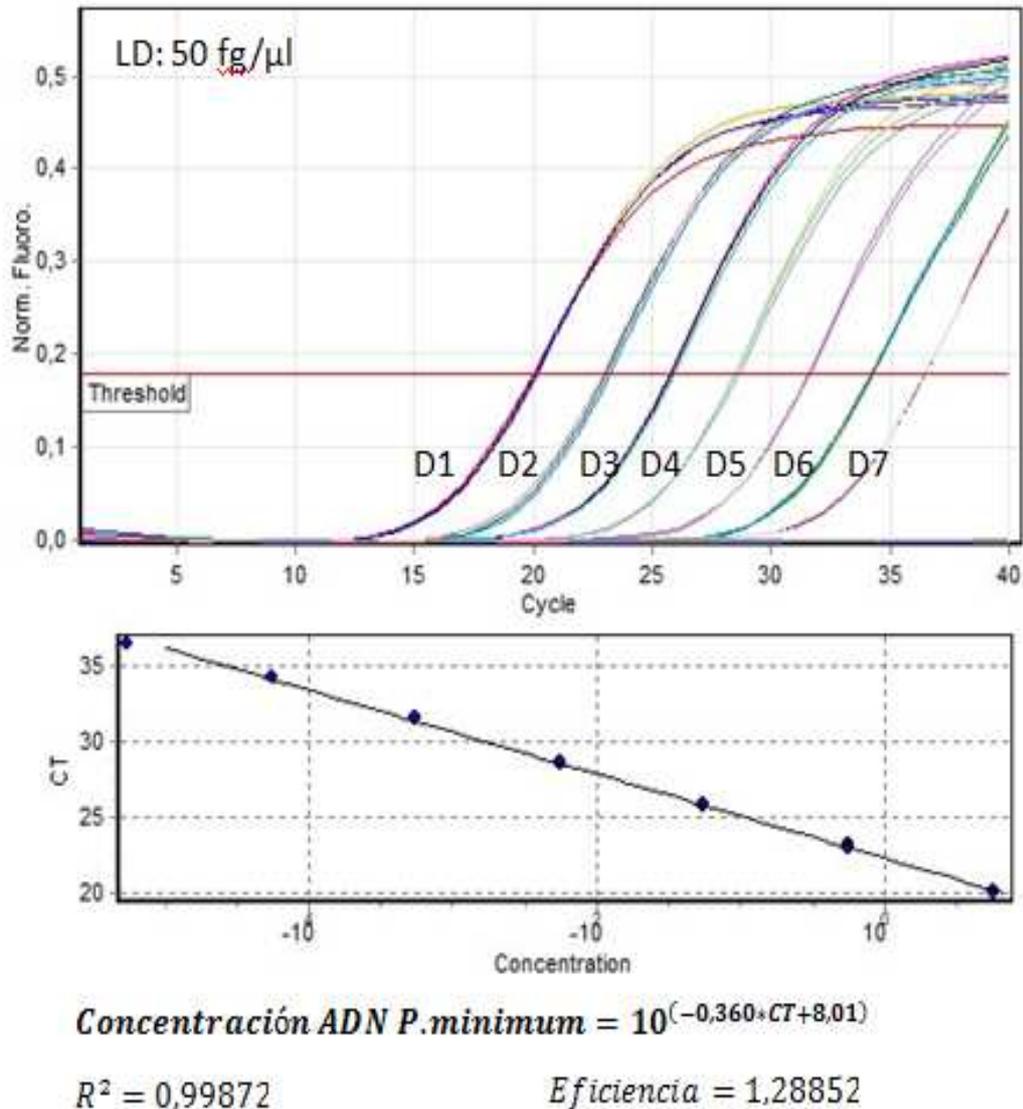


Figura 8.- Curva patrón, parámetros y límite de detección (LD) para la cuantificación del ADN de *Phaeoacremonium minimum* a partir del protocolo descrito por Pouzolet y col.,(2013). D1-D7 diluciones seriadas.

En la Figura 9 se muestran los resultados de los aislamientos (porcentaje de incidencia acumulada) de *Pm. minimum* a los 15, 30 y 45 días después la inoculación de los patrones. Los aislamientos resultaron negativos en los controles no inoculados. En materiales como Riparia Grand Glabre, Carden 31, Fercal, Grimaldi, Courderc 1202, Martinez Zaporta y Ruggieri 343, no se consiguió aislar el patógeno a los 45 días de la inoculación. En algunos patrones como Grezot, Castel 7605, Millardet, Grasset 420A y Castel 6971 se observaron muy pocas plantas inoculadas infectadas por el patógeno. En ellas, el aislamiento de *Pm. minimum* resultó ser positivo alcanzando valores de incidencia acumulada entre el 5 y 10% y solo pasados 45 días tras la inoculación. La Figura 9 también muestra aislamientos positivos a los 30 y 45 días después de la inoculación en un gran número de patrones. En los patrones Courderc 616, RG8, Paulsen1447, RG2, RG6, RG1, RG9, RG7, RG4 el porcentaje de incidencia acumulada varió del 25% al 63% a los 15 días, de 9% a 66% a los 30 días y de 5% a 66% a los 45 días después de la inoculación.

Las muestras RG2, RG6, RG1, RG7, RG9 y RG4, fueron los materiales de los que se consiguió aislar *Pm. minimum* más fácilmente, alcanzando casi un 70% de incidencia acumulada en el material RG4. Estos mismos patrones que presentaron el máximo porcentaje a los 45 días fueron los mismos que ya presentaron aislamientos del patógeno positivo desde el inicio del ensayo, a los 15 días tras la inoculación.

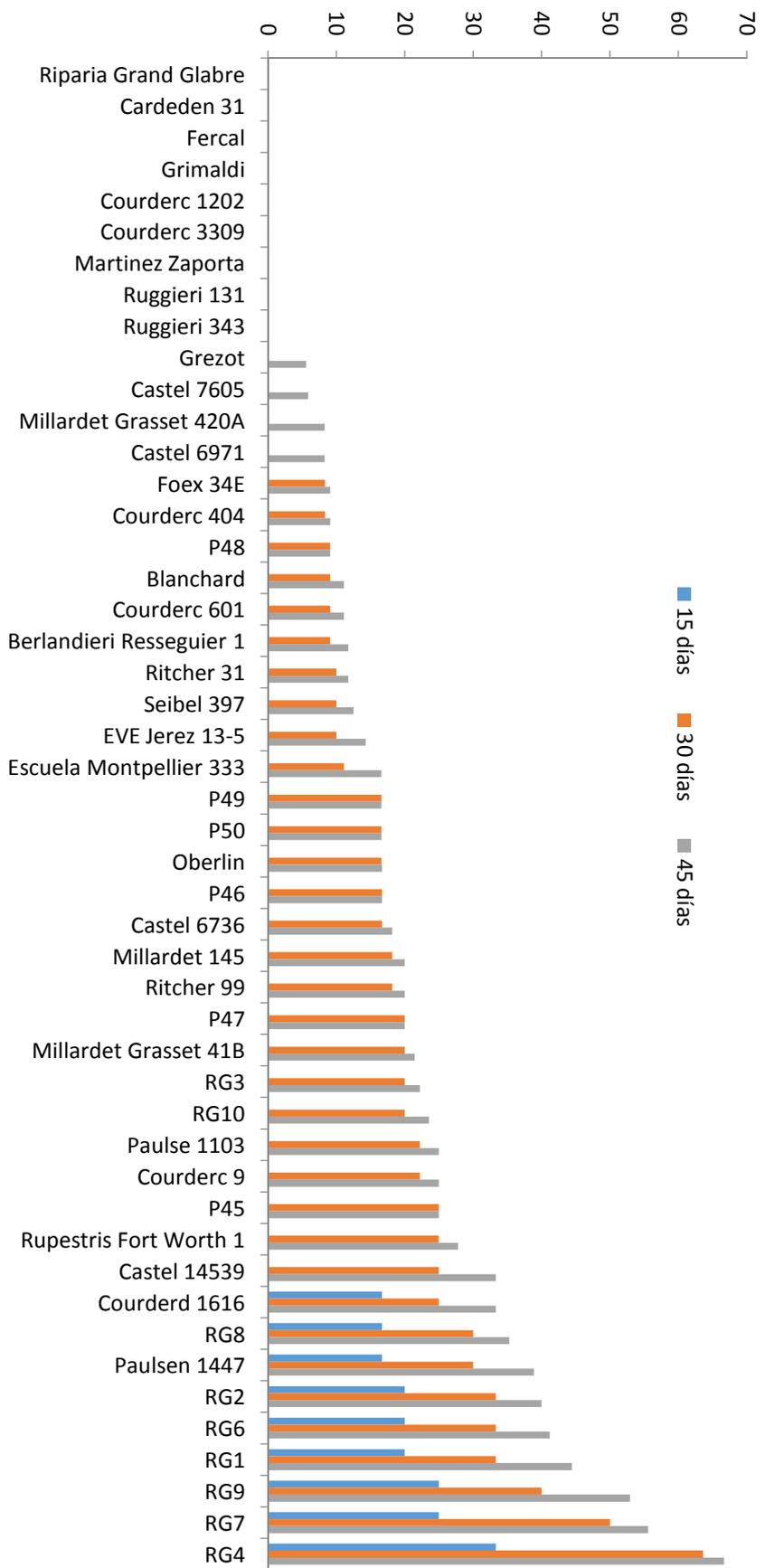


Figura 9. - Porcentaje de plantas afectadas por Pm. minimum según los resultados de aislamiento positivo a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación.

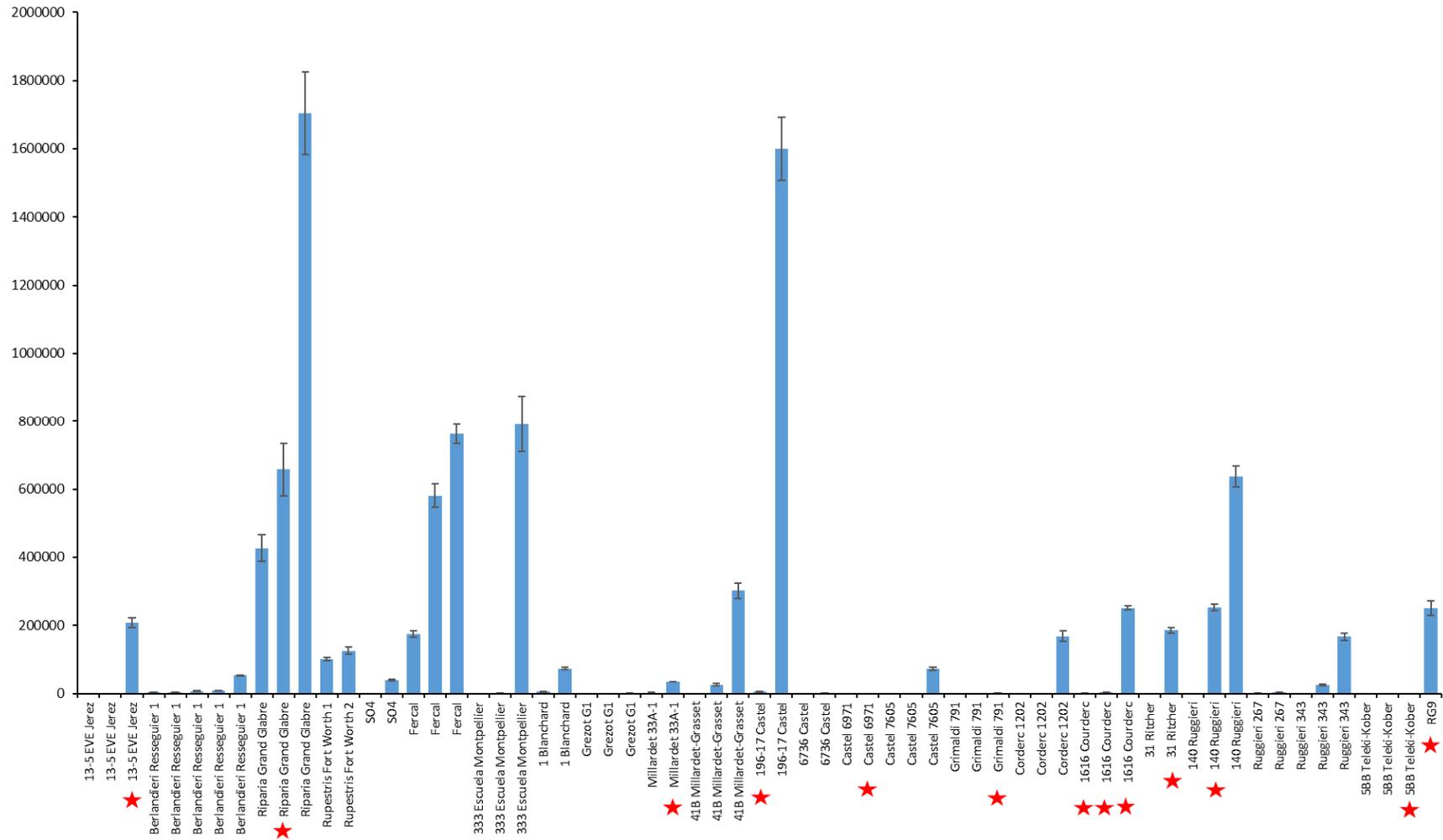


Figura 10.- Concentraciones de ADN del patógeno (fg/μl) obtenidas para cada material (3 plantas independientes) a los 45 días de la inoculación. Los asteriscos rojos marcan las plantas en las que se detectó ADN y sin embargo no se consiguió aislar el patógeno.

La Figura 10 representa las concentraciones de ADN patógeno obtenidas para cada planta inoculada de cada material a los 45 días de la inoculación. Los resultados fueron muy variables, obteniéndose concentraciones muy elevadas en algunos casos y en otros nulas o muy bajas. Se observaron casos en los que las 3 repeticiones (fragmentos o plantas inoculadas) de un mismo material mostraron concentraciones de ADN muy distintas, como es el caso de 196-17 Grand Castel.

Los asteriscos rojos en la Figura 10 indican las plantas en las que se detectó ADN y, sin embargo, no se consiguió aislar el patógeno. Estas plantas representan el 20% del total de los patrones estudiados en el trabajo. Pouzolet y col. (2013) indican en su estudio que uno de los problemas de la metodología de qPCR, es que, en la práctica, pueden aparecer señales de amplificación inespecíficas y tardías, que conducen a falsos positivos. Sin embargo, en general se considera que la detección mediante qPCR es mucho más sensible que las técnicas tradicionales de aislamiento de hongos (Gasparic y col., 2010). Además, en el presente estudio, se comprobó que no se obtenían productos inespecíficos con el análisis de curvas de fusión y no se consideraron positivas las detecciones por encima del LD y su Ct correspondiente. La mayor eficiencia en la detección de *Pm. minimum* comparado con el éxito en los aislamientos podría explicarse por las dificultades que supone aislar este hongo en medio de cultivo, ya que su crecimiento es lento comparado con otros hongos (Gramaje y col., 2015), que pueden enmascarar sus colonias.

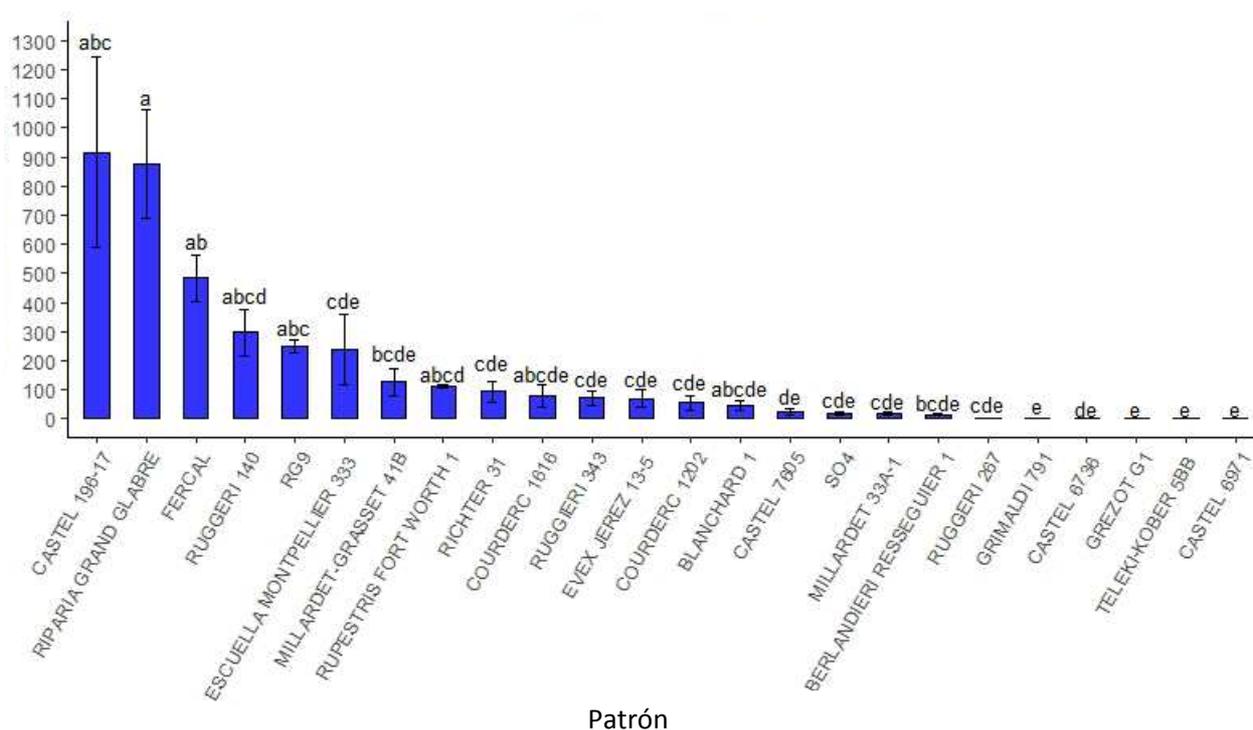


Figura 11.- Concentraciones de ADN del patógeno (pg/μl) obtenidas para cada material (promedio de 3 plantas) a los 45 días de la inoculación.

En la Figura 11 se muestra el promedio de concentraciones de ADN de *Pm. minimum*, obtenidas para las 3 plantas por material a los 45 días de la inoculación. Se muestra una clasificación de mayor a menor cantidad promedio de ADN al final del estudio. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre la

concentración de ADN de *Pm. minimum* detectada en los diferentes materiales. Los materiales Castel 196-17, Riparia Grand Glabre, Fercal, Ruggeri 140 y RG9 fueron los materiales con más concentración de ADN de *Pm. minimum* detectada a los 45 días. Por ejemplo, en el material Castel 196-17 los valores de concentración promedio alcanzaron 900 pg/μl. En el lado derecho de la Figura 11 se encuentran los materiales Grimaldi 791, Castel 6736, Grezot 91, Teleki-Kober 5BB, Castel 6971 en los cuales apenas se detectó ADN del patógeno.

Mercado-Blanco y col., estudiaron en 2003 la resistencia de patrones silvestres de olivo al hongo vascular *Verticillium dahliae* que utiliza unos mecanismos de infección similares a *Pm. minimum* en vid. En su trabajo, Mercado-Blanco y col. (2003) demostraron que la resistencia en patrones silvestres de olivo está correlacionada con la capacidad de la planta para reducir cuantitativamente la extensión de la colonización del tallo por el patógeno. Pouzolet y col., (2013) demostraron utilizando la misma metodología de qPCR usada en el presente trabajo, que existe una correlación entre el grado de colonización de *Pm. minimum* y el diámetro de los vasos del xilema en plantas de vid, de tal forma que a menor diámetro mayor resistencia a la colonización por parte del patógeno.

En el presente trabajo se ha evaluado la colonización de *Pm. minimum* en diferentes patrones de vid y se ha demostrado que la metodología basada en el uso de qPCR es más sensible y ofrece información cuantitativa mucho más fiable que las técnicas basadas en aislamiento en medio de cultivo. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ADN del patógeno en los diferentes materiales y por tanto en el grado de colonización y tolerancia que pueden presentar frente a la enfermedad.

Los materiales en los que menos ADN de *Pm. minimum* se detectó fueron Grimaldi 791, Teleki-Kober 5BB, Castel 6971 y Grezot G1; éstos serían, por tanto, los menos colonizados por el patógeno. Una baja capacidad de colonización del material, podría conferirles una ventaja frente al resto de materiales, ya que indica que serían patrones con un grado de tolerancia mayor a la enfermedad que podrían ser utilizados en programas de mejora vegetal.

La mayoría de estos materiales con potencial como patrones resistentes son el resultado de cruces entre *V. riparia* x *V. berlandieri*. Gramaje y col., en 2010 sugirieron después de inocular diferentes materiales con *Pa. Chlamydospora*, *Phaeocremonium spp.* y realizar aislamientos que los cruces de portainjertos de vides de *V. riparia* x *V. berlandieri* podrían ser menos susceptibles a los hongos asociados a las EFMV. Sin embargo, tal y como indica Jaspers y col. (2007) en un estudio sobre el aislamiento hongos causantes del pie negro en portainjertos inoculados, ninguno de los materiales evaluados, entre los que se encontraban por ejemplo Riparia o Millardet, mostraron resistencia completa a patógenos causantes del pie negro y de la enfermedad de Petri.

Las concentraciones más bajas de ADN del patógeno en ciertos patrones podría explicarse por una reacción de defensa general, no específica, de la planta frente a la enfermedad. En este contexto, se ha observado que el micelio de *Phaeocremonium* dentro del xilema se somete a lisis debido a interacciones de incompatibilidad entre la planta y el hongo (Heinz y col., 1998).

Los patrones resistentes, pueden implicar mecanismos de defensa que disminuyen la penetración radicular y la propagación lateral del hongo en tejidos vasculares, como por ejemplo a través de un refuerzo en la pared celular con una disposición callosa, aumentando la lignificación, etc. (Eync et al., 2009).

El presente trabajo aporta información interesante sobre la caracterización de la sensibilidad a *Pm. minimum* de una amplia colección de portainjertos de vid en base a la concentración de ADN detectada del patógeno en los materiales estudiados previamente inoculados. Una de las conclusiones importantes es que la metodología de qPCR es mucho más sensible para realizar las evaluaciones comparadas con los métodos tradicionales de aislamiento. Los resultados obtenidos podrán resultar útiles para continuar trabajando en la búsqueda de portainjertos de vid resistentes a los patógenos asociados a las EFMV.

V.Conclusiones

V. CONCLUSIONES

- Se consiguió aislar *Phaeoacremonium minimum* en los portainjertos a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación con resultados variables.
- Se ha puesto a punto la metodología de cuantificación de *Phaeoacremonium minimum* basada en qPCR descrita por Pouzolet y col. en 2013, obteniéndose un límite de detección de 50 fg/μl de ADN del patógeno.
- La metodología basada en el uso de qPCR resultó ser más sensible para la caracterización de los portainjertos y ofrece información cuantitativa mucho más fiable que las técnicas basadas en aislamiento en medio de cultivo.
- Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ADN del patógeno detectadas en los diferentes materiales estudiados.
- Los materiales en los que menos ADN de *Phaeoacremonium minimum* se detectó fueron Grimaldi 791, Teleki-Kober 5BB, Castel 6971 y Grezot G1.

VI. Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFIA

- AGUSTÍ-BRISACH, C.; ARMENGOL, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, 52: 245-261.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2011). Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. *Plant Disease*, 95: 803-810.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2015). Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. *Plant Disease*, 99: 976-981.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; MOSTERT, L.; ARMENGOL, J. (2014). Detection and quantification of *Ilyonectria spp.* associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex nested PCR and quantitative PCR. *Plant Pathology*, 63: 316-322.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; RAYA, M^oC.; RHOUMAY, A.; TRAPERO, A. (2017). Identificación de especies de hongos asociadas con la muerte de la rama de olivo y la resistencia de los cultivares de mesa a *Neofusicoccum mediterraneum* y *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 101: 2.
- ARMENGOL, J. (2017) Epidemiología de los hongos de la madera de la vid: ¿cómo sobreviven, se dispersan e infectan a las plantas? *Phytoma España*, 288: 43-45.
- BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOU-MANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. (2012) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62: 243-265.
- BIOCOMPARE.COM (2017). *Quantitative PCR (qPCR)*. Disponible en: <http://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7217-Real-Time-PCR/> [Visto el 20 de mayo de 2019].
- BOUQUET, A., TORREGROSA, L., IOCCO, P., & R THOMAS, M. (2006). Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Methods in Molecular Biology*, 344: 273-285.
- BUSTIN, AS.; BENES, V.; GARSON, JÁ.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER R, NOLAN, T.; PFAFFL, MW.; SHIPLEY, GL.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55:611–622.
- CARRERO, J. M. A.; PLANES, S. (2008). *Plagas del campo* (13 ed.): Mundi-Prensa.
- CHEN P.; LEE B.; ROBB J. (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 283–91.
- CLOETE, M.; FISCHER, M.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; (2015). Hymenochaetales associated with esca-related Wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 54: 299-312.
- COLELLA, C.; MIACOLA, C.; AMENDUNI, M.; D'AMICO, M.; BUBICI, G.; CIRULLI, M.; (2008). Sources of verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant Pathology*, 57: 533–9.

- DE LA FUENTE, M. (2016) Grapevine Trunk Diseases. A review. Edita OIV (Organización Internacional de la viña y del Vino). Paris. 24.
- EDWARDS, J.; MARCHI, G.; PASCOE, I. (2001). Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 303-310.
- EYNC, C.; KOOPMANN, B.; KARLOVSKY, P.; VON TIEDEMANN, A. (2009). Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology*, 99: 802.
- FELICIANO, AJ.; GUBLER, WD. (2001). Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 387-393.
- FISCHER, M. (2002). Una nueva especie de basidiomicetos de madera en descomposición asociada con las escalas de vid: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1: 315-324.
- GARCÍA, B.; FUENTES, A.; MARTÍNEZ, J. A.; EGEA, C.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; RUIZ-GARCÍA, L. (2014). Selección de nuevas variedades de vid resistentes a enfermedades fúngicas, generadas mediante cruzamientos con Monastrell. Paper presentado en III Workshop en Investigación Agroalimentaria, Cartagena.
- GASPARIC, MB.; TENG, T.; LA PAZ, JL.; HOLST-JENSEN, A.; ESTEVE, T.; ZEL, J.; GRUDEN, K. (2010) Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chemistry*, 396: 2023–2029.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. (2011). Patógenos fúngicos del tronco en el proceso de propagación de la vid: posibles fuentes de inóculo, detección, identificación y estrategias de manejo. *Plant Disease*, 95: 1040-1055.
- 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.
- GRAMAJE, D.; MAÑAS, F.; LERMA, ML.; MUÑOZ, RM.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2014). Efecto del tratamiento con agua caliente sobre la viabilidad de la vid, los componentes de rendimiento y la composición del mosto. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20: 144-148.
- GRAMAJE, D.; MOSTERT, L.; GROENEWALD, JZ.; CROUS, PW. (2015). *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, XXX: 1-25.
- GRAMAJE, D.; URBEZ-TORRES, JR.; SOSNOWSKI, MR. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102: 12-39.
- HEINZ, R.; LEE, SW.; SAPARNO, A.; NAZAR, RN.; ROBB, J. (1998). Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52: 385–96.
- HOFSTETTER, V.; BUYCK, V.; 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.

- HUANG, C.; LIAO, D.; WU, H.; SHEN, W.; CHUNG, C. (2016) Cyclone-based spore trapping, quantitative real-time polymerase chain reaction and high resolution melting analysis for monitoring airborne inoculum of *Magnaportheoryzae*. *Annals of Applied Biology*, 169: 75-90.
- JASPERS, M.; BLEACH, C.M.; HERVEY, I.C. (2007). Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:114.
- LUQUE, J.; ELENA, G.; GARCIA-FIGUERES, F.; REYES, J.; BARRIOS, G.; LEGORBURU, FJ. (2014). Infecciones de neutral de heridas de poda por patógenos fúngicos del tronco en vides maduras en Cataluña (noreste de España). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20: 134-143.
- MAGRAMA (2014). Guía de gestión integrada de plagas “Uva de transformación”. Edita Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 201.
- MAPA (2019). Vitivinicultura - Producciones agrícolas - Agricultura. Mapama.gob.es. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/> [Visto el 5 de Junio de 2019].
- MARKAKIS EA.; TJAMOS, SE.; ANTONIOU, PP.; ROUSSOS, PA.; PAPLOMATAS, EJ.; TJAMOS, EC. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non defoliating *Verticillium dahlia*. *Plant Disease*, 94: 1156–62.
- MONDELLO, V.; BATTISTON, E.; PINTO, C.; COPPIN, C.; TROTEL-AZIZ, P.; CLÉMENT, C.; MUGNAI, L.; FONTAINE, F. (2018) Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*. Vol. 102, n°7.
- MONTAIGNE, E.; COELHO, A.; KHEFIFI, L. (2016). Economic issues and perspectives on innovation in new resistant grapevine varieties in France. *Wine Economics and Policy*, Vol. 5, 2: 73-77.
- MOSTERT, L.; GROENEWALD, JZ.; SUMMERBELL, RC.; GAMS W.; CROUS PW. (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54: 1-115.
- MOYO,P.; ALLSOPP, E.; ROETS, F.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F. (2014) Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology*, 104:1063-1069.
- MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83: 404-416.
- NIGRO, F.; BOSCIA, D.; ANELMI, I.; IPPOLITO A, (2013). Fungal species associated with a severe decline of olive in southern Italy. *Plant Pathology*, 95: 668.
- POUZOLET, J.; MAILHAC, N.; COUDERC, C.; BESSON, X.; DAYDÉ, J.; LUMMERZHEIM M. (2016) A method to detect and quantify *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97:10163–10175.
- SPARAPANO, L, BRUNO, G.; GRANITI, B. (2001) Three-year observation of grapevines cross-inoculated with Esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 376–386.

ÚRBEZ-TORRES, JR, Y GUBLER, WD (2011). Susceptibilidad de heridas de poda de vid a la infección por *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*, 60: 261-270.

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*, 46:5-17.