



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Titulación
Grado en Enología

**TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN
MASIVA APLICADAS A LA
VITICULTURA**

Alumno: María del Prado Orduñez Cáceres

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

Julio de 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS	7
4. METODOLOGÍA.....	7
4.1. CLASIFICACIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	7
4.2. REDACCIÓN DEL TEXTO	7
5. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	8
5.1. TÉCNICAS MOLECULARES DISPONIBLES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL VIÑEDO.....	8
5.2. APLICACIONES EN LA PROTECCIÓN DEL VIÑEDO	14
5.3. IDENTIFICACIÓN Y MANEJO DE HONGOS MICORRÍCICOS.....	15
5.4. IDENTIFICACIÓN Y MANEJO DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA	17
5.4.1. PIE NEGRO.....	17
5.4.2. ENFERMEDAD DE PETRI Y YESCA.....	19
5.4.3. EUTIPIOSIS	21
5.4.4. PODREDUMBRE GRIS.....	22
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. RESUMEN

Los viñedos son reservorios naturales de diversidad biológica. La diversidad encontrada en los suelos de viñedos es determinante no solo por las propiedades físico-químicas y nutricionales del suelo, sino también por la salud, el rendimiento y la calidad de la uva.

El principal inconveniente que encontramos en los cultivos de vid y especialmente en plantaciones de viñedo joven son las enfermedades fúngicas de madera que afectan de manera importante al cultivo de la vid. Las plantas infectadas muestran alteraciones internas en la madera como necrosis y pudriciones, dando lugar a un menor desarrollo de la planta e incluso la muerte. Actualmente, se utilizan diversos productos fitosanitarios de origen químico para combatir dichas enfermedades, lo cuales pueden no ser inocuos y cuando entran en la cadena alimentaria originar alteraciones en la salud humana. Además, según el tipo de agricultura, estarán o no autorizados para su empleo. En su lugar, se pueden utilizar medidas de control biológico caracterizado por el uso de microorganismos para combatir los distintos agentes que causan las enfermedades derivador de la información obtenida al utilizar técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN. Estas técnicas permitirán detectar de una forma precisa y precoz la presencia/ausencia de microorganismos en suelos vitícolas y en la cepa en sí para, posteriormente, tomar medidas acordes respetando en todo momento el cultivo.

Por ello, la presente revisión bibliográfica analiza las nuevas tecnologías utilizadas para la detección, identificación y caracterización de microorganismos, mediante el empleo de técnicas moleculares (PCR y sus derivadas y secuenciación) en casos particulares o en enfermedades fúngicas relevantes en el viñedo.

2. INTRODUCCIÓN

En el año 2017, el área total mundial de viñedo alcanzó los 7.5 millones de hectáreas, más de la mitad se encuentran en el continente europeo. España cuenta con una superficie de 1.1 millones de hectáreas, seguido de Francia e Italia (OIV, 2017).

Como todos los cultivos alberga un reservorio natural de microorganismos, que interactúan con ella, juegan un papel importante en la evolución de la uva, y, en la fermentación y producción del vino (Pinto *et al.*, 2014, entre otros). Las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo del viñedo están influenciadas por las propiedades físico-químicas y nutricionales del suelo, por las condiciones externas como la ubicación del viñedo, las prácticas vitícolas, la variedad de la vid, el rendimiento y la calidad de la uva (Morgan *et al.*, 2017). Dichos microorganismos se conocen como el microbioma de la vid y se compone de hongos filamentosos, levaduras y bacterias.

El microbioma influye en las relaciones planta-suelo, por ello es importante controlar los microorganismos, no solamente en el suelo, sino también dentro de la planta. Dentro del microbioma del suelo, las plantas y los hongos se pueden establecer tres tipos de interacciones: (i) simbiosis: la interacción puede resultar beneficiosa o neutra, ya que aumentan la disponibilidad de los nutrientes y estimula el desarrollo de la planta. (ii) competencia: se genera competencia por el espacio y los nutrientes, inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos antibióticos, y por último (iii) patogenicidad: se produce un debilitamiento de la planta. Estos microorganismos también pueden influir sobre la planta y sobre todo en la sucesión biológica de la bodega, pudiendo arrastrarse desde el viñedo hasta la misma (Pinto *et al.*, 2016)

Para conocer el microbioma de la vid se nos plantean tres cuestiones importantes, la primera referida a qué microorganismos están presentes en el medio ambiente, la segunda cuál es su comportamiento y la tercera cuestión cómo afectan al viñedo las poblaciones de esos microorganismos.

Para responder a la primera de las cuestiones, se requiere aplicar métodos de análisis genéticos de gran precisión, a nivel intraespecífico puesto que pequeñas variaciones genéticas pueden afectar de forma distinta a la calidad de uva o vino. Para la segunda y tercera cuestiones, la identificación debe ser complementada mediante la evaluación de sus propiedades fenotípicas y genotípicas y también a nivel cuantitativo y fisiológico.

La viticultura es el sector agrícola en el que se utilizan más tratamientos fitosanitarios (plaguicidas, fungicidas, herbicidas, etc.) para el control de plagas y enfermedades por su valor añadido de producto (Pinto *et al.*, 2016). Estos tratamientos no son inocuos, y tienen consecuencias tanto desde el punto de vista ecológico, puesto que afectan a la vid y al entorno, como sanitarias ya que cuando entran en la cadena alimenticia pueden influir de una forma indirecta en la salud humana. Los distintos países establecen legislaciones para garantizar la sostenibilidad de las plantaciones y, junto con los consejos reguladores de las Denominaciones de Origen, también establecen requisitos de calidad tanto en la viticultura como en las prácticas de enología cuyo objetivo es definir estándares de calidad.

Los reglamentos que se aplican para regular todas las actividades se recogen en el Reglamento (CE) 128/2009, en el que la Comisión Europea estableció una serie de normas para el uso sostenible de plaguicidas a fin de reducir los riesgos y los impactos del uso de plaguicidas en la salud de las personas y en el medio ambiente. Una de las claves del reglamento determina que *"...cada Estado miembro debe desarrollar y adoptar su Plan de acción nacional y establecer objetivos cuantitativos, metas, medidas y calendarios para reducir los riesgos y los impactos del uso de plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente, y fomentar el desarrollo y la introducción del manejo integrado de plagas y de enfoques o técnicas alternativos para reducir la dependencia en el uso de plaguicidas"*.

El uso de productos fitosanitarios y sus límites máximos residuales (LMR) en la Unión Europea está regulado por el Reglamento (CE) n°396/2005, el cual afecta directamente a la salud pública y es pertinente para el funcionamiento del mercado interior. Y establece que, *"...en favor de la libre circulación de mercancías, de la equidad de las condiciones de competencia entre los Estados miembros, así como de un nivel elevado de protección de los consumidores es conveniente fijar a escala comunitaria los límites máximos de residuos (LMR) en productos de origen vegetal y animal, teniendo en cuenta las buenas prácticas agrícolas"*. Algunos de estos productos fitosanitarios no están permitidos en determinadas formas de cultivo. Los distintos tipos de agricultura está regulada por los Reglamentos (CE) n° 834/2007 y n° 889/2008, y el n° 203/2012 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008 y certificada por distintos organismos dependiendo del país en el cual nos encontremos (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de símbolos y organismos de certificación de los distintos tipos de agricultura según el ámbito geográfico afectado (Fuente: elaboración propia).



Agricultura ecológica UE



Certificación internacional ecológica



Etiqueta ecológica europea



Certificación internacional ecológica



Entidad de certificación Agroalimentaria



Certificación agricultura biológica francesa



Certificación orgánica

A mediados del siglo XIX, ya se sabía que la transformación de la uva en vino era el resultado de un proceso microbiano descrito por Luis Pasteur (revisado entre otros, por Bokulich *et al.*, 2016). Desde entonces, la diversidad de la microbiota del viñedo, de la uva y del vino ha sido ampliamente investigada, utilizando los métodos disponibles en cada momento, inicialmente, métodos microbiológicos tradicionales que implican el uso de la microscopía, el cultivo en diferentes medios y el análisis de algunas características bioquímicas. A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios relacionados con el microbioma de la vid, presentando distintas dificultades como: (i) los síntomas externos presentan una gran inestabilidad, es decir, se ha demostrado que las plantas afectadas pueden desarrollar síntomas externos durante un ciclo vegetativo y no mostrarlos al año siguiente (Di Marco *et al.*, 2000); (ii) la aparición de los síntomas de cada enfermedad se relaciona con factores como las condiciones climáticas, principalmente la humedad y la temperatura (Surico *et al.*, 2004); (iii) la sintomatología es versátil, múltiple, compleja y a veces confusa ya que un mismo síntoma puede asociarse a varias patologías.

Actualmente, debido a las evidentes consecuencias de la actividad microbiana, se han propuesto diferentes métodos para diagnosticar las condiciones fitosanitarias de los viñedos (Belda *et al.*, 2017). Entre ellas encontramos el uso de imágenes aéreas multispectrales tomadas por satélite o por drones, técnicas moleculares basadas en ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cococlin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Abbasian *et al.*, 2015). Una variante de esta técnica, la qPCR (PCR cuantitativa) o RT-PCR (PCR a tiempo real), permite además cuantificar las poblaciones de cada especie, cepa o tipo de microorganismos presentes en las muestras. Cabe

destacar que, las dos últimas décadas han estado caracterizadas por un cambio importante en los enfoques utilizados para el examen microbiano, debido a la introducción de distintos métodos moleculares que incluyen los siguientes: SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic ADN-PCR*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) que han sido empleados para estudiar el perfil genético de la diversidad microbiana de la vid y el vino (Bruison *et al.*, 2012), y en particular, aquellos basados en los espaciadores genéticos de los genes del ADNr (ADN ribosómico). También la secuenciación del ADN, especialmente cuando se apoya en la amplificación mediante PCR o utiliza nuevas plataformas desarrolladas en este siglo es de gran utilidad para comprender y diagnosticar enfermedades (Kchouck *et al.*, 2017).

El empleo de nuevas técnicas moleculares permite detectar la mayoría de los microorganismos (tradicionalmente ignorados) presentes en muestras complejas y deducir las interacciones de la microbiota del viñedo con su estado sanitario y productivo. Para este tipo de análisis, se deben diseñar algoritmos que permitan relacionar los datos microbiológicos de muestras ambientales (suelo, agua, ... etc.) con aspectos como la tipicidad del viñedo o con la ocurrencia de anomalías en el proceso de elaboración del vino. Así, en los últimos años se han generado gran cantidad de datos y metadatos que permiten identificar microorganismos presentes con precisión, los cuales han dado lugar a la creación de grandes bancos de información que se están utilizando con profusión. Este tipo de datos permiten establecer correlaciones estadísticas entre presencia/ausencia de microorganismos con cuestiones fisiológicas en el viñedo y en un tiempo posterior intentar establecer relaciones causa/efecto (Belda I. *et al.*, 2016).

Una de las empresas más relevantes en este sentido es BiomeMakers (véase <https://biomemakers.com>), se trata de una empresa española de biotecnología con sede en California, especializada en la identificación y comprensión del microbioma. Entre otras aplicaciones, han desarrollado un test de monitorización del microbioma del suelo del viñedo a través de una herramienta denominada WineSeq (véase <https://wineseq.com>), que pretenden relacionar los datos metagenómicos de los suelos de los viñedos con datos referidos a enfermedades, tratamientos y control de microorganismos. Para el desarrollo de esta tecnología se llevó a cabo el estudio del microbioma del suelo de bodegas pertenecientes a 14 países diferentes, constituyendo un total de 1.500 muestras de tierra procedente de sus viñedos. Gracias a estos estudios han desarrollado una base de datos que relaciona los microbiomas asociados a las diferentes características del suelo.

La necesidad de realizar esta revisión bibliográfica está relacionada con la diversa información que se tiene sobre la utilización de tecnologías novedosas que permiten monitorear y diagnosticar las condiciones fitosanitarias del viñedo. Ya que preservar la salud de los viñedos es la única forma de garantizar su vida futura, y para ello es necesario comprender desde la base las posibles enfermedades y controlar y prevenir su desarrollo en el campo. Como bien se sabe, estas técnicas aún son poco conocidas en el mundo de la viticultura, si bien, en otros ámbitos, como la salud humana están siendo ampliamente utilizadas.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es revisar el conocimiento actual sobre la caracterización de la comunidad microbiana del viñedo, y sus aplicaciones a la ecología del viñedo, centrándonos en las diversas interacciones de los microorganismos con la planta. Este tipo de conocimiento permitirá desarrollar estrategias menos agresivas enfocadas a una viticultura sostenible compatible con las cada vez más habituales técnicas de cultivo ecológicas, orgánicas o biológicas y biodinámicas, con el fin de obtener productos inocuos para la salud de los consumidores.

Para ello, como objetivo específico, se analizarán las técnicas moleculares disponibles para la identificación y caracterización del microbioma desde su inicio hasta la actualidad. Y también se analizará la aplicación de dichas técnicas para dos aspectos clave en la protección del viñedo:

- La identificación de hongos micorrícicos en el suelo del viñedo y sus beneficios.
- La determinación de agentes causales enfermedades fúngicas de la madera.

4. METODOLOGÍA

Para realizar la búsqueda de los distintos artículos revisados en el presente trabajo, se han utilizado varias bases de datos como: ProQuest, Scopus, Dialnet, Web of Science y Science Direct con las palabras clave (utilizadas tanto en inglés como en español): metagenómica, microbioma del viñedo, enfermedades fúngicas de madera, micorrizas y las siglas PCR, qPCR, ITS, RAPD, AFLP, entre otras.

4.1. CLASIFICACIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

La bibliográfica se ha clasificado en:

- Artículos generales sobre técnicas de identificación masiva de microorganismos, los cuales han sido utilizados para describir las distintas técnicas disponibles y comprender su utilización.
- Artículos de hongos beneficiosos para el viñedo como las micorrizas.
- Artículos sobre enfermedades fúngicas de la madera y sus correspondientes ensayos utilizando estas técnicas.

4.2. REDACCIÓN DEL TEXTO

El documento utilizado para la redacción del texto está basado en las normas recogidas en “Normas de Estilo y Formato de TFG Enología”, aunque también nos hemos basado en la nueva propuesta aprobada por la Junta de Centro y el Comité del Grado de Enología, que ha entrado en vigor en el curso 2018/2019, en formato de “Normas de Revisión bibliográfica para Enología”. Además, hemos seguido el documento escrito por Fernández *et al.*, en 2008 “Para empezar a entendernos”, en dicho artículo establece que para realizar una buena revisión bibliográfica se deben revisar al menos 30 – 50 artículos y citar como máximo 30. Dado que los artículos revisados son superiores a 30 artículos y que la utilización de estas nuevas tecnologías es reciente, algunos de los parámetros elegidos para seleccionar los distintos artículos son los siguientes:

- Relevancia de autores y número de citas.
- Fecha de publicación de artículos, teniendo en cuenta que más del 80% de ellos son publicados a partir de 2010.

- Considerar que cuando la información está recogida en más de dos artículos, se opta en poner el más reciente o de mayor impacto.

5. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

5.1. TÉCNICAS MOLECULARES DISPONIBLES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL VIÑEDO

La identificación del microbioma presente en muestras ambientales del viñedo se apoya básicamente en dos grupos de técnicas, que han evolucionado a lo largo del tiempo:

1. La secuenciación nucleotídica:
2. Los marcadores moleculares

Las primeras tecnologías de secuenciación fueron desarrolladas simultáneamente en 1977 por Sanger, de la Universidad de Cambridge y Maxam & Gilbert, de la Universidad de Harvard (Kchouck *et al.*, 2017). Una de estas técnicas de “primera generación de secuenciación”, se convirtió en la técnica de secuenciación más utilizada por su alta eficiencia y su amplia versatilidad (Pareek *et al.*, 2011). A partir de 1990, cuando se empezó a conocer el Genoma Humano, empezaron a surgir variaciones en la técnica de secuenciación de Sanger, como el uso de fluorocromos no radiactivos, su combinación con PCR, la automatización de parte del proceso..., entre otras y así, se ha mantenido vigente durante 30 años, y se sigue utilizando en la actualidad de forma puntual. Sin embargo, su alto coste en términos económicos tanto de tiempo como de mano de obra han limitado su utilización.

A partir de los años 2000 y a raíz de la necesidad de secuenciar grandes cantidades de ADN a bajo coste y con el mayor rendimiento posible, surgieron nuevas técnicas de secuenciación, dando lugar a lo que se ha denominado “segunda generación de secuenciación” basada en: (1) generación de millones de lecturas en paralelo, (2) acortar tiempos y (3) disminuir el coste (Kchouck *et al.*, 2017). Entre las nuevas tecnologías encontramos tres plataformas principales como la secuenciación de Roche/454® que apareció en el mercado en el año 2005, utilizando la técnica de la pirosecuenciación (Mardis, 2008), que permite registrar la energía liberada durante la rotura del pirofosfato en cada unión de un nuevo nucleótido. En 2010, Life Technologies comercializó la tecnología de secuenciación Ion Torrent TM se basa en la detección del ion hidrógeno liberado durante el proceso de secuenciación (Rothberg, 2011) y en cuanto a las principales ventajas se centra en las longitudes de lecturas más largas y el tiempo de ejecución entre 2 y 8 horas (Reuter, 2015). Y, por último, la compañía Solexa desarrolló una nueva tecnología denominada Illumina®, en esta técnica las muestras de ADN se fragmentan al azar, admiten secuencias masivas paralelas utilizando un método patentado que detecta bases simples, ya que se incorporan a cadenas de ADN en crecimiento. Esta última es la técnica más utilizada en el mercado de secuenciación masiva (Balasubramaniam, 2015).

Las tecnologías de secuenciación masiva han revolucionado el análisis del ADN y han sido las más utilizadas en comparación con la primera generación, pero en los últimos años, para corregir los problemas causados por las tecnologías de segunda generación, los científicos han desarrollado nuevas técnicas conocidas como “tercera generación de secuenciación”. Esta “tercera generación” pretender ofrecer un bajo coste de secuenciación y una fácil preparación de la muestra sin necesidad de amplificar por PCR y tratar de realizar la propia secuenciación a partir de una única molécula de ADN, en un tiempo más rápido consiguiendo lecturas más largas y detectar variaciones en la

estructura de los cromosomas (Goodwin *et al.*, 2016). En esta “tercera generación” se ha desarrollado una tecnología Single Molecule Real-Time (SMRT), desarrollada por la casa Pacific Biosciences que trata de ofrecer una secuenciación de las características descritas.

La introducción de todas estas metodologías de identificación genética, generalmente basados en la PCR o en sus derivadas cuantitativas como la qPCR y en la secuenciación masiva crea nuevas oportunidades para el desarrollo y mejora del conocimiento del microbioma del viñedo ya que permite a los investigadores estudiar la complejidad y evolución de las poblaciones microbianas. Asociadas a algunas otras tecnologías complementarias, permiten analizar de forma conjunta todos los genes (genómica), todas las proteínas (proteómica), todos los metabolitos (metabolómica) y todos los transcritos del ARN mensajero (transcriptómica) y sus datos acompañantes, lo cual convierte estas tecnologías en metagenómica, metametabolómica, metaproteómica y metatranscriptómica (Marchesi y Ravel, 2015). La siguiente tabla recoge las distintas ciencias (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de las ciencias -ómicas y sus objetivos (Fuente: elaboración propia).

Ciencia	Descripción	Objetivo
<i>Genómica</i>	Intenta comprender el contenido, la organización, la función y la evolución de la información molecular del ADN contenida, a partir del estudio directo y comparado de la secuencia nucleotídica de genomas completos	Permite conocer y estudiar las variaciones del genoma a distintos niveles
<i>Transcriptómica</i>	Estudio conjunto de ARNm (ARN mensajero) que existe en una célula, tejido u órgano.	Consiste en analizar miles de moléculas de ARNm, mediante diferentes técnicas
<i>Proteómica</i>	Estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función, siendo partes vitales de los microorganismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células.	Permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos
<i>Metabolómica</i>	Cataloga y cuantifica a las moléculas pequeñas que se encuentran en los sistemas biológicos como consecuencia de su metabolismo.	Permite estudiar la función de los genes, a través de la mutación, deleción o inserción de estos y la aparición de distintos tipos de moléculas pequeñas (metabolitos)

El origen y el desarrollo, de los distintos microorganismos que encontramos en el viñedo se pueden detectar mediante marcadores moleculares específicos para cada uno de

ellos. Algunas de estas técnicas utilizadas para la obtención de marcadores moleculares son:

- **PCR (Polymerase Chain Reaction).** Se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica rápida, específica y fácil de realizar. Es una técnica científica desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis, el cual en el año 1993 recibió el Premio Nobel de Química por este descubrimiento.

Se basa en el uso de cebadores específicos de regiones genómicas conservadas para aumentar el número de copias de material genético viral y detectar su presencia en un determinado material vegetal (Olmos *et al.*, 2010).

El proceso que tiene lugar durante la PCR se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación; En primer lugar, es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen. Esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C. Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada.

La especificidad de la PCR depende, fundamentalmente, de la secuencia de los iniciadores que se utilicen, pero también la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción (además de depender de la secuencia de los cebadores). Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde; en condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos (Mullis, 1990).

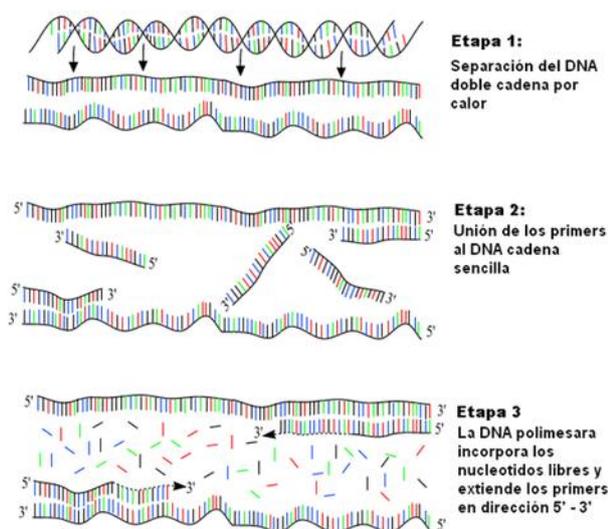


Figura 1. Etapas de un ciclo de amplificación de PCR (Mas *et al.*, 2016)

- **qPCR (PCR cuantitativa).** Se utiliza para detectar, caracterizar y cuantificar regiones del ADN. La técnica de qPCR es una variante a la tecnología tradicional de la PCR en la cual se han introducido algunas mejoras como; (i) la combinación

de amplificar y detectar ácidos nucleicos en un solo paso; (ii) puede usar una menor cantidad de material de partida que la PCR convencional; (iii) es posible la cuantificación del producto según la detección fluorescente; (iv) no hay proceso de análisis post-amplificación. La principal característica que define la qPCR (o PCR a tiempo real) es la posibilidad de obtener resultados cuantitativos. El análisis cuantitativo de ADN puede realizarse de dos formas, mediante cuantificación relativa o absoluta. La cuantificación relativa permite determinar los cambios en la expresión de un gen de una muestra con respecto a un estándar externo o la expresión de un gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). En la cuantificación absoluta, la concentración inicial de ADN diana en la muestra se puede cuantificar de manera muy sencilla, creando una curva estándar o patrón.

La qPCR puede realizarse mediante el empleo de diferentes moléculas químicas, entre las más utilizadas se encuentran la molécula de SYBR Green y las sondas TaqMan. El colorante SYBR Green I detecta ADN bicatenario, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Este compuesto se une al ADN intercalándose en la doble hélice, y genera una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Una de las ventajas es que es económico y se puede utilizar para la RT-PCR de 1 o 2 pasos. El problema principal que surge al emplear este tipo de molécula es que la fluorescencia observada puede ser causada tanto por productos de PCR específicos como por no específicos, debido al hecho de que el SYBR Green I se une al ADN de doble hebra presente en la reacción, de manera inespecífica en cuanto a su secuencia (Witter et al. 1997).

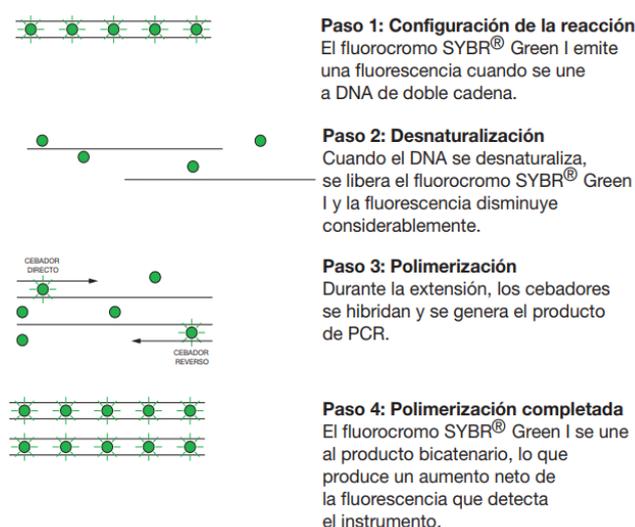


Figura 2. Funcionalidad ensayos SYBR (Fuente: Publicación de la Universidad de Córdoba, 2016)

Los ensayos TaqMan permiten aumentar la especificidad mediante la utilización de sondas internas adicionales en la mezcla de reacción. Las sondas TaqMan están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo, y presentan en 3' un grupo que absorbe la fluorescencia emitida por dicho fluoróforo y que se denomina "quencher" (Livak et al., 1995).

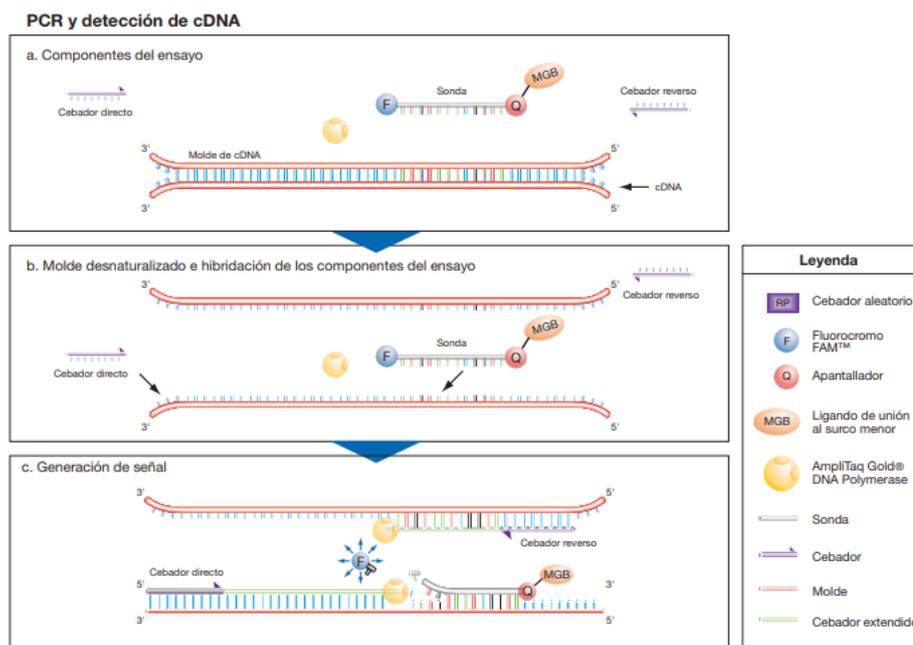


Figura 3. Funcionalidad ensayos Taqman (Fuente: Publicación de la Universidad de Córdoba, 2016)

Ambos sistemas de qPCR, basados en SYBR Green y TaqMan, se han empleado con éxito para la cuantificación de hongos como *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* (hongos causantes de la enfermedad Petri en viñedo que veremos en el apartado 5.4.5).

- **Marcadores derivados de la PCR:**

Existen dos variantes de la PCR: la PCR dirigida o la PCR al azar, las cuales han caído bastante en desuso para la identificación puesto que ahora conocemos los genomas y se pueden dirigir a zonas concretas.

→ Dirigidos a regiones específicas:

- ITS y región del ADNr: el genoma de la mayoría de los microorganismos está organizado en genes, que se pueden transcribir, según las condiciones ambientales y cuya traducción deriva en la expresión de caracteres morfológicos o fisiológicos. Estos genes están separados entre sí por regiones que ni se traducen ni si transcriben, conocidas así por regiones intergénicas o regiones no transcritas. Una de las regiones más estudiada, es la región del ADNr, particularmente la región ITS (por sus siglas: *Internal Transcribed Sequence*) formada a su vez por dos regiones ITS1 e ITS2 separadas por el gen 5.8S cuya variabilidad permite comparar entre sí taxones cercanos (Llorens *et al.*, 1997). Los genes que codifican para los ARNs (ARN ribosómicos 18S, 5.8S y 28S) se disponen formando una unidad de transcripción compuesta por (Figura 4): ETS (espaciador externo que se transcribe por delante del gen 18S), el gen 18S, ITS1 (espaciador interno entre el gen 18S y el 5.8S), el gen 5.8S, ITS2 (espaciador interno entre el gen 5.8S y el 28S), 28S y otro ETS (espaciador externo que se transcribe por detrás del gen 28S). En un locus ribosómico, estas unidades de transcripción se repiten en tándem separados por una secuencia NTS (espaciador no transcrito).

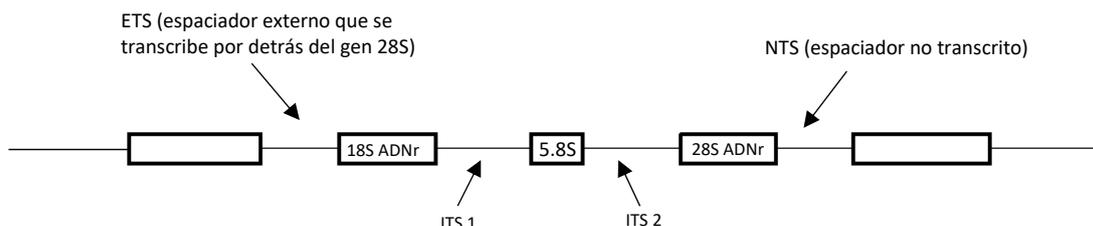


Figura 4. Representación gráfica de los genes del ADNr y distintos cebadores para su amplificación por PCR (imagen modificada de White *et al.*, 1990).

- RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*) o también conocidos como “fragmentos de restricción de longitud polimórfica”, fueron los primeros marcadores de ADN desarrollados. Se basan en la digestión del ADN con una enzima de restricción, la separación mediante electroforesis de los fragmentos generados, la hibridación con una sonda y la visualización de los resultados por distintas técnicas según el marcaje de la sonda (Azofeifa-Delgado, 2006). Actualmente sólo se utilizan de forma puntual sobre fragmentos de ADN amplificados por PCR, aunque inicialmente sí fueron muy utilizados en la identificación de organismos.
- No dirigidos (al azar)
 - RADPs (*Random Amplified Polymorphic DNA*): se caracteriza por su simplicidad, rapidez y bajo coste. En esta técnica, se utilizan uno o varios iniciadores de secuencia muy corta (típicamente, unos 6 nucleótidos) que tienen numerosas dianas a lo largo del genoma (Llorens *et al.*, 1997). Es un método con problemas de reproducibilidad, como consecuencia de las bajas temperaturas de anillamiento a las que se realizan las reacciones de PCR y la sensibilidad del método a las variaciones de los reactivos y equipos utilizados. Aunque esta técnica ha sido empleada con éxito en la detección de *Phomopsis viticola* (Pollastro *et al.*, 2001) y *Eutypa lata* (Lardner *et al.*, 2005), cada vez se utiliza menos, debido a que se han desarrollado marcadores más precisos y fiables.
 - AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*): es una técnica utilizada para detectar polimorfismos en el ADN cuando no se dispone de información sobre el genoma. Después de la digestión con enzimas de restricción del ADN, se selecciona un subconjunto de fragmentos de ADN para la amplificación y visualización por PCR. Es una técnica que se ha utilizado con éxito en los años 90 y 2000, sin embargo, al igual que las técnicas descritas anteriormente (RAPDs y RFLPs) están siendo reemplazadas por técnicas más sencillas y universales,

Los marcadores RAPD y AFLP son de naturaleza dominante y no requieren ningún conocimiento previo sobre el genoma estudiado. Primero se describió la técnica RAPD (Williams *et al.*, 1990), en la que se emplea un oligonucleótido corto que se une de forma aleatoria a regiones del genoma amplificando fragmentos de ADN al azar. Posteriormente, se describió la técnica de AFLP es más compleja ya que se amplifican grupos de fragmentos que han sido obtenidos por digestión del ADN con endonucleasas (Vos *et al.*, 1995).

5.2. APLICACIONES EN LA PROTECCIÓN DEL VIÑEDO

Dentro del amplio escenario de la microbiota presente en el viñedo, los microorganismos presentes como hemos mencionado previamente pueden afectar tanto a la salud de la planta como a la salud humana de manera perjudicial o beneficiosa. Como, por ejemplo, los hongos micotoxigénicos en los alimentos, es considerada como peligro en el ámbito de la seguridad alimentaria (Sarroco, 2018). Las micotoxinas son compuestos tóxicos de bajo peso molecular, resultantes del metabolismo secundario fúngico, que ocurre de forma natural en aproximadamente el 25% de los cultivos alimentarios y forrajeros mundiales (FAO, 2003). Son producto principal de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Sweeney y Dobson, 1998) y un dan lugar a la única micotoxina regulada en vino que es la ocratoxina A (OTA), considerando la resolución CST 1/2002 que fija el contenido máximo de ocratoxina A (OTA) en 2,0 µg/l para los vinos (OIV, 2005).

Anteriormente, antes de que se realizasen estudios de la microbiota del viñedo, la forma habitual de detener la propagación de una infección era sustituir las vides infectadas por nuevas plantaciones, junto con un tratamiento adecuado para paralizar la propagación de las infecciones, implicando así importantes inversiones de dinero (Belda et al., 2017). Como hemos podido comprobar en los apartados anteriores, se han propuesto diferentes estrategias para diagnosticar las condiciones fitosanitarias de los viñedos, como el uso de drones que permite tomar imágenes aéreas multispectrales con el fin de controlar tanto el estado de la vid como cualquier factor que pueda repercutir en el desarrollo de la misma. Sin embargo, existen inconvenientes puesto que cuando aparecen síntomas externos no permite usar dichas tecnológicas con el objetivo de diagnóstico (Belda et al., 2017). Por ello, para el control general de la microbiota, la manera más respetuosa con el medio ambiente es analizar el microbioma del suelo para detectar presencia de bacterias y hongos patógenos. De esta manera, es posible reducir el uso de los tratamientos fitosanitarios para minimizar sus efectos adversos y utilizar las menores cantidades posibles y sólo utilizarlos en los casos en lo que hubiera un peligro real, ya que en varias ocasiones los tratamientos se realizan de forma genérica y son sólo tratamientos preventivos. Con un mayor conocimiento del microbioma se podrían utilizar tratamientos específicos y adaptados a las condiciones concretas del viñedo, evitando que los tratamientos pasen a la cadena alimentaria, respetando las interacciones de los microorganismos del suelo con la planta y manteniendo un equilibrio ecológico. Por lo tanto, es interesante usar tecnologías para identificar y detectar los posibles microorganismos con propiedades protectoras de cultivos. Además, sirven para respetar la biodiversidad que se pierde al utilizar los productos fitosanitarios sin control.

Como hemos mencionado previamente, los microorganismos pueden interactuar con la planta de muy diversas maneras, entre las relaciones más habituales podemos encontrar las micorrizas, que es un caso típico de simbiosis y la patogenicidad como las enfermedades fúngicas de madera que provocan una pérdida progresiva de vigor, reduciendo la calidad y cantidad de la cosecha e incluso llegando a provocar la muerte de las cepas. Los síntomas son diferentes según la enfermedad desarrollada. Las enfermedades más comunes encontradas en viñedo son eutipiosis, ocasionada por el hongo *Eutypa lata*, enfermedad de Petri, pie negro, podredumbre gris, ocasionada por *Botrytis cinerea* etc. algunas de estas enfermedades tienen un diagnóstico difícil y actualmente no existen tratamientos efectivos para controlarlos, por ello se recurre a su detección mediante técnicas basadas en PCR, qPCR y evitar así su diseminación. Sin embargo, estas técnicas también pueden darnos resultados sesgados.

5.3. IDENTIFICACIÓN Y MANEJO DE HONGOS MICORRÍDICOS

Entre los microorganismos del suelo, los hongos micorrícicos son capaces de establecer asociaciones simbióticas con las raíces de la vid (Trouvelot *et al.*, 2015) siendo probablemente la interacción beneficiosa más extendida entre plantas y microorganismos. Se produce cuando las plantas y las hifas de los hongos reconocen moléculas señal en la rizosfera y realizan un intercambio de compuestos solubles en el suelo (Trouvelot *et al.*, 2015). El crecimiento de estos hongos se ve afectado en cierta manera por el manejo y las características del suelo y en menor medida por la etapa de desarrollo de la vid (Schreiner, 2009).

Entre los principales beneficios de la micorrización se suelen citar los siguientes: (i) mejoran el acceso de la planta al agua y a los nutrientes del suelo y regula el transporte de fósforo, nitrógeno y otros elementos que hay en el suelo; (ii) aumentan la tolerancia a la salinidad, reducen la clorosis férrica y la toxicidad de metales pesados del suelo; (iii) protegen frente a enfermedades.

Existen numerosos estudios basados en metagenómica en los que se establecen relaciones en cuanto a la presencia y cantidad de determinados hongos o microorganismos con la presencia de micorrizas y sus beneficios asociados entre determinados tipos de hongos como: *Glomus s.str.*, *Rhizophagus*, *Funneliformis*, *Claroideoglomus* y *Paraglomus*. (Holland *et al.*, 2014). Pero a veces es difícil su detección puesto que no suelen ser capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedante (Trouvelot *et al.*, 2015) y carecen de las estructuras en las que se basa la identificación morfológica de las especies.

Entre los beneficios concretos documentados de las micorrizas en vid podemos destacar:

- Contribución significativa de absorción de fósforo y realizar un control ecológico y con menos residuos que pudiesen entrar en la cadena alimentaria (Smith *et al.*, 2011)
- Absorción de nitrógeno (Smith *et al.*, 2010).

Tanto el aporte de fósforo como el de nitrógeno, hace que microorganismos que no tenían una presencia numéricamente significativa aprovechen estos nutrientes para desarrollarse. Este tipo de interacciones entre microorganismos no siempre dan lugar a resultados beneficiosos para la vid, sino que también puede ocasionar un problema, por la generación de residuos y por contribuir al desorden del ecosistema biológico.

Entre otros elementos que regulan funciones básicas que las plantas, encontramos otros elementos químicos que encontramos en el suelo están el potasio, el magnesio, el zinc y el boro. Los suelos con deficiencia de potasio son más propensos a sufrir problemas derivados de la sequía y el frío (Reynolds, 2010), y la deficiencia de boro puede ocasionar corrimiento en el racimo.

Las principales ventajas que encontramos en la asociación viñedo-hongos micorrícicos son:

- Mejorar la absorción de agua y nutrientes al mismo tiempo (Kohler *et al.*, 2008).
- Mejorar la absorción de nutrientes del suelo y la tolerancia a la salinidad y aumentan el crecimiento del viñedo (Khalil, 2013)
- Reducir las altas concentraciones de caliza activa que pueden inhibir la disponibilidad de hierro, e inducir a la clorosis férrica afectando al rendimiento de la planta y a la calidad de la uva (Bavaresco *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta todas las ventajas que suponen los hongos micorrícicos, también esta simbiosis se establece como una alternativa para el desarrollo de una agricultura sostenible, reemplazando el uso de productos fitosanitarios que, como hemos mencionado previamente, pueden ocasionar graves problemas si pasan a la cadena alimentaria. Para ello debemos conocer la biodiversidad de los hongos micorrícicos presentes en los suelos de los viñedos y su efecto a lo largo del ciclo vegetativo, ya que no todas las variedades de vid presentan la misma afinidad. También se ha observado que las condiciones ambientales y geográficas pueden afectar a las distintas especies de hongos e interferir en los beneficios previamente descritos.

También en otros estudios como el de Trouvelot *et al.*, en 2015 se ha observado que la presencia de ciertos hongos micorrícicos promueve la acumulación de metabolitos secundarios más abundantes en las plantas como terpenos o fenoles. Aún no está claro por qué o a través de qué rutas bioquímicas podrían aumentar la cantidad de metabolitos secundarios en las plantas colonizadas por hongos micorrícicos, pero se cree que una razón sería la mayor absorción de nutrientes principalmente de fósforo, que actuaría como precursor de acetyl-CoA, ATP y NADPH, que participan en la biosíntesis de isoprenoides. Del mismo modo, la mayor disponibilidad de nitrógeno actuaría como precursor de diferentes aminoácidos (Zeng *et al.*, 2013). En nuestro caso, la vid posee altas cantidades de polifenoles, encontrándose principalmente en raíces, tallos, hojas, flores y frutos y que van a depender de los factores genéticos, factores culturales y factores ambientales. En el estudio elaborado por Sbrana *et al.*, en el año 2014, se recoge que la presencia de hongos micorrícicos favorece la acumulación de polifenoles y genera nuevas oportunidades para el empleo de los mismos.

Por otro lado, en el estudio elaborado por Krüger *et al.*, en el año 2009 establecen que la caracterización molecular de hongos micorrícicos se logra en la mayoría de los casos mediante la utilización de PCR. El principal inconveniente que encontraron en este estudio fue la extracción del ADN de las esporas, puesto que la mayoría de las veces se realiza en raíces. Además, hay muchas especies no se pueden identificar de manera veraz a partir de muestras de campo heterogéneas, y cuando se identifican se pueden determinar características morfológicas similares como una sola especie.

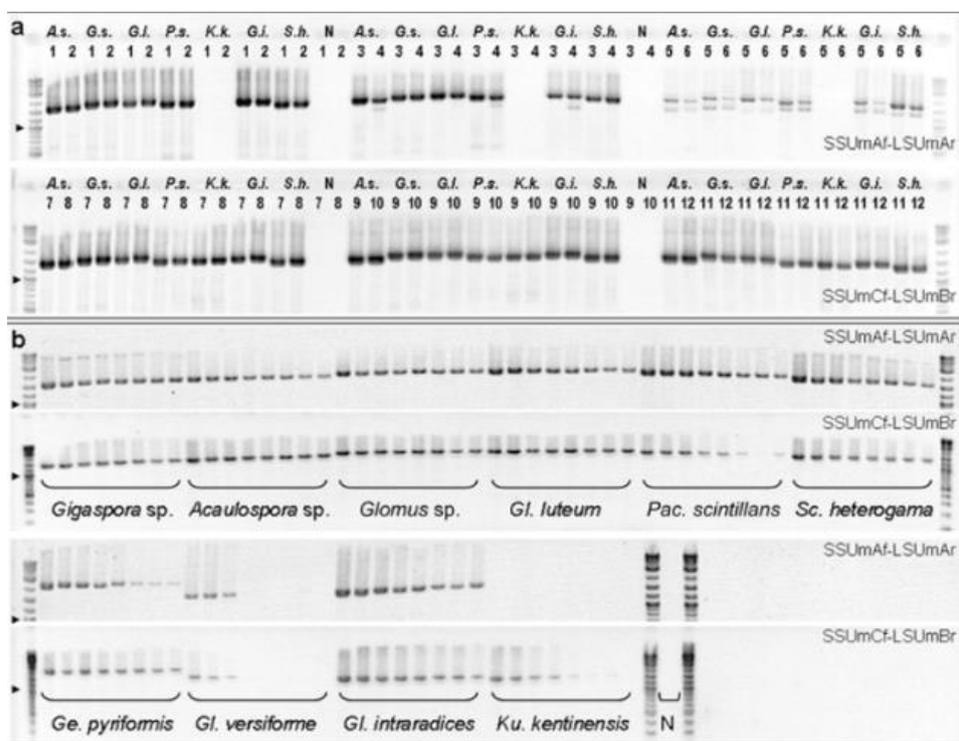


Figura 5. Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores SSUmAf – LSUmAr y SSUmCf – LSUmBr. (a) PCR en fragmentos de ADN, utilizando diferentes temperaturas y una concentración 1 ng μ l⁻¹. A.s., *Acaulospora* sp.; G.s., *Glomus* sp.; G.l., *Glomus luteum*; P.s., *Pacispora scintillans*; K.k., *Kuklospora kentinensis*; G.i., *Glomus intraradices*; S.h., *Scutellospora heterogama*. (b) PCR usando 1 μ l de una dilución de plásmidos 10 veces (100 pg - 0.01 fg μ l⁻¹) como plantilla, correspondiente a 5 × 10⁷ a 5 moléculas plasmídicas en 20 μ l de volumen de reacción de PCR. (Fuente: Krüger *et al.*, 2009).

Concluyendo así, que actualmente no se han realizado muchos estudios sobre la aplicación de técnicas moleculares sobre hongos micorrícicos.

5.4. IDENTIFICACIÓN Y MANEJO DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA MADERA

Las enfermedades fúngicas de madera son una de las principales amenazas para la sostenibilidad de la viticultura, causando importantes pérdidas económicas debido a la reducción de los rendimientos, acortan la vida útil de los viñedos y provocan elevados costes de gestión de cultivos por la utilización de medidas preventivas culturales y químicas (Bertsch *et al.*, 2013; Kaplan *et al.*, 2016). A partir de la década de 1990 es cuando se comienza a detectar un incremento de estas enfermedades en todo el mundo, principalmente en plantaciones jóvenes (Agustí-Brisach *et al.*, 2013), que se han visto favorecidas por diversos factores como son los cambios en las prácticas culturales y en el manejo de los viñedos.

A principios del siglo XX, para controlar algunas enfermedades fúngicas se utilizó arsenito sódico. Entre las características más importantes de este compuesto son la alta toxicidad y su capacidad de penetrar hasta el xilema de la cepa, aniquilando a la mayor parte de los hongos (Larignon *et al.*, 2008). Sin embargo, las sales de arsenito sódico son cancerígenas, lo que ha llevado a la prohibición de su uso en todos los países y para todos los cultivos (Spinosi *et al.*, 2009). También en algunos países a principios de la década de 2000 se prohibió la utilización de fungicidas como bencimidazol y bromuro de metilo debido a preocupaciones ambientales y de salud pública (Decoin 2001; EPA 1997). Posteriormente, tras la prohibición de dichos compuestos, se han investigado otros productos químicos de síntesis para sustituirles, pero en los ensayos realizados se ha demostrado una menor eficiencia, por tanto, la erradicación completa de las enfermedades no ha sido posible (Sosnowski *et al.*, 2010). El control se centra en la prevención de las enfermedades (Urbez-Torres, 2011) y para ello se ha elaborado un programa de manejo integrado que incluye estrategias de control físico, químico, biológico (Halleen y Fourie, 2016).

Algunas enfermedades presentan sintomatologías similares, lo que dificulta su identificación. Por ejemplo, la enfermedad de Petri y el pie negro se caracterizan por brotación tardía, entrenudos cortos, follaje clorótico con bordes necróticos y marchitez de hojas o brotes enteros. Para distinguir el agente causante de la patología, se recurre a la identificación de ADN a través de técnicas moleculares.

A continuación, se describen las principales enfermedades fúngicas de madera que encontramos en viñedo y el papel que pueden jugar en su detección, identificación y el empleo de las técnicas moleculares.

5.4.1. PIE NEGRO

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1961 en Francia (Maluta y Larignon, 1991), pero a finales de los años 90 fue cuando comenzaron a incrementarse las incidencias provocadas por esta enfermedad y empezó a ser relevante (Gramaje y Armengol, 2011).

En España, los primeros estudios que se conocen son del año 2000, en los cuales se establece que el pie negro está caracterizado por dañar el sistema radicular de las plantas jóvenes. En ellas se puede observar lesiones oscuras y necróticas que causan una reducción en la masa radicular. En la parte aérea se observan coloraciones oscuras y necrosis que se inician desde la base del sarmiento (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Como consecuencia de estos daños, las cepas presentan un menor desarrollo y vigor, ausencia o retraso de la brotación, entrenudos cortos, clorosis en hojas o una muerte prematura de la planta durante el periodo vegetativo (Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Los síntomas de la parte aérea podrían confundirse con otras enfermedades como la Enfermedad de Petri que mencionaremos a continuación. En ese sentido es recomendable la utilización de técnicas moleculares para su identificación y así elaborar un plan de control eficaz y específico para dicha enfermedad.



Figura 6. Pie negro (Imagen izquierda: <https://wineseq.com>; Imagen derecha: Petit *et al.*, 2011)

En cuando a los agentes causantes del pie negro, encontramos especies de distintos géneros que han sido descritos a lo largo de estos últimos años: *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Ilyonectria* y *Dactylonectria* (Agustí-Brisach y Armengol, 2014).

Las dos primeras especies asociadas fueron *Cylindrocarpon destructans* que han sido reclasificadas como *Cylindrocarpon liriodendri* (Halleen *et al.*, 2006) en base a las secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADNr y el gen de la β -tubulina, y *C. obtusisporium* (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975) y posteriormente en el año 2004 Halleen *et al.*, describieron una nueva especie *C. macrodidymum* y en el año 2008 se describió otra especie denominada *C. pauciseotatum*. Por ello, se puede afirmar que son diversos los agentes causantes de la enfermedad del pie negro que no son identificables por su caracterización fenotípica.

Actualmente no se disponen de medidas de control eficaces que erradiquen estos hongos en plantaciones establecidas, por lo que se llevan a cabo estrategias de prevención y vigilancia o la utilización de plantas cebo para detectar la presencia de este hongo (Agustí-Brisach *et al.*, 2014). Las medidas que se han desarrollado a lo largo de los años para el control del Pie Negro se basan en medidas culturales: utilización de material vegetal sano y prevención o corrección de las condiciones que pueden ocasionar estrés a la planta y favorecer el desarrollo de la enfermedad. Se han utilizado también medidas de control químico como aplicación de fungicidas o medidas de control biológico, como en el estudio de Halleen *et al.*, 2007 en el cual utilizaron el hongo *Trichoderma harzianum*, pero determinaron que el empleo de dicho hongo no era capaz de mantener las plantas con un nivel de infección bajo.

Cada vez más se están recurriendo al empleo de nuevas técnicas moleculares basadas en la extracción de ADN, amplificación por PCR y su posterior secuenciación para la

detección de los agentes causantes de esta enfermedad. Basados en los resultados de la secuenciación se han desarrollado iniciadores específicos para hacer ensayos mediante métodos convencionales de PCR. Sin embargo, éstos no permiten una cuantificación precisa del ADN (Filion *et al.*, 2003), por ello se recurre a la PCR cuantitativa (qPCR) ya que tiene la ventaja de ser más eficaz y requiere menos tiempo. En el estudio elaborado por Agustí-Brisach en el año 2014, tanto en campos de vivero como en campos de planta madre, se confirmó que los suelos de ambos tipos de campo son fuente importante de inóculo para los patógenos del pie negro. Por ello las técnicas de qPCR, tienen un elevado valor para la detección rápida de patógenos.

5.4.2. ENFERMEDAD DE PETRI Y YESCA.

Phaeomoniella chlamydospora y *Phaeoacremonium aleophilum* son dos especies de hongos que causan pérdidas económicas en viñedo. Dado que apenas se conocen medidas de control se deben tomar medidas defensivas proactivas (Martin *et al.*, 2012). Ambas especies están asociadas a la enfermedad de Petri en planta joven y a Yesca en planta adulta.

La enfermedad de Petri recibe el nombre del primer investigador que describió los síntomas típicos de esta enfermedad (Petri, 1912). Las plantas que se ven afectadas por dicha enfermedad presentan hojas pequeñas, cloróticas y necrosadas. Se observan brotaciones raquílicas y entrenudos cotos. Estos síntomas, a veces, se pueden confundir con que casusa la enfermedad de Pie Negro (Figura 6).



Figura 7. Enfermedad de Petri (Fuente: MAPAMA)

Por otro lado, la yesca es otra de las enfermedades más conocidas de la vid (Larginon, 2004), especialmente desde la prohibición de arsenito sódico en el 2003 (Surico *et al.*, 2006). Tiene dos formas de propagación: (i) Lenta y crónica: las plantas que se ven afectadas presentan hojas decoloradas con necrosis internerviales de color amarillo en variedades blancas y de color rojizo en variedades tintas. Comienza desde las hojas basales y se va extendiendo por el resto de la planta. (ii) forma rápida o apopléjica: consiste en la muerte súbita de la planta. Las hojas adquieren una coloración verde-grisácea y la planta acaba secándose totalmente con las hojas unidas al sarmiento. Se debe a un drástico desequilibrio hídrico. Se da principalmente en terrenos arcillosos, profundos y frescos. En las bayas también suelen aparecer puntos necrosados, desarrollados en la epidermis.



Figura 8. Yesca en vid y síntomas foliares (Fuente: MAPAMA)

A lo largo de los años, diversos investigadores han tratado de estudiar el papel que desempeña el hongo *Phaeoconiella chlamydospora* en las enfermedades de la madera de vid y, aunque las investigaciones van avanzando, todavía no se conoce completamente la etiología de dichas enfermedades, pero se ha estudiado que pueden estar influenciadas por varios hongos que desencadenan distintas infecciones provocando necrosis en los vasos. Según Mugnai *et al.*, 1999 las esporas de hongo *Phaeoconiella chlamydospora* penetran por los cortes de poda y las heridas (Edwards *et al.*, 2007). Por tanto, para identificar especies de un mismo género se han propuesto diferentes sistemas taxonómicos, basados en caracteres morfológicos, como el tamaño y la forma de conidios; formación de clamidosporas y estructura de conidióforos. Sin embargo, muchas veces, especies muy relacionadas entre sí difieren en un solo carácter, lo que puede inducir a una mala identificación. Además, estas técnicas, como hemos citado anteriormente requieren gran cantidad de material y experiencia taxonómica para obtener resultados correctos. Las técnicas moleculares, basadas en análisis de ADN, corresponden a metodologías más rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras. Se han realizado varios estudios referidos a la utilización de la PCR, la primera estrategia propuesta, fue la utilización de PCR en tiempo real propuesta por Overton *et al.*, en el año 2004, usando la técnica SYBR-Green®, la cual se emplea como colorante para la cuantificación de ADN de doble hélice en algunos métodos de PCR cuantitativa o para la visualización del ADN en la electroforesis con geles de agarosa. Otro estudio, como el de Edwards *et al.* en 2007 analiza los ensayos de PCR en tiempo real utilizando la técnica de TaqMan®. Aroca *et al.*, en el año 2007 estudiaron la posibilidad de desarrollar una estrategia basada en PCR dirigida a regiones específicas (ITS1/ITS4 del ADNr o 5.8S del ARNr) para detectar e identificar especies de *Phaeoacremonium* aisladas de vides comparándola con los métodos tradicionales (cultivo tradicional en placa Petri). Los resultados se recogen en la Figura 9.

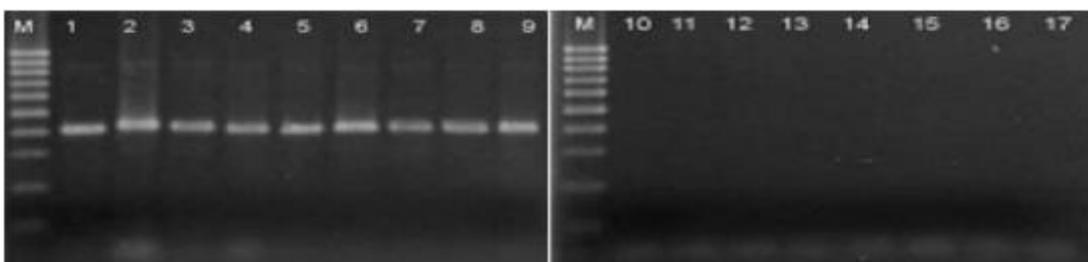


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de los fragmentos de ADN amplificados por PCR con los iniciadores ITS1/ITS4 de *Phaeoacremonium* (1- 9) y otras especies de hongos (10-17). 1-*P.aleophilum*; 2-*P.parasiticum*; 3-*P.inflatipes*; 4-*P.mortoniae*; 5-*P.angustus*; 6-*P.viticola*; 7-*P.scolyti*; 8-*P.krajdenii*; 9-*P.venezuelense*; 10-*Botryosphaeria parva*; 11-*Phomopsis spp.*; 12-*Phaeomoniella chlamydospora*; 13-*Botryosphaeria obusa*; 14-*Phialophora mustea*; 15-*Phialemonium dimorphosporum*; 16-ADN uva; 17- No hay ADN. (Fuente: Aroca *et al.*, 2007)

El análisis se realizó en 6 horas (extracción y PCR), mientras que el cultivo y el posterior aislamiento de los hongos tardaron entre 20 y 30 días. Los resultados obtenidos fueron la rapidez y la sensibilidad, cualidades que son relevantes cuando se trata de este patógeno, pues dicho hongo crece muy lentamente en un medio de crecimiento enriquecido lo que hace que la detección sea prolongada. Esto también significa que *Phaeoacremonium* suele estar cubierto de otros patógenos, que pueden ocultar resultados positivos de detección. La comparación de los métodos tradicionales y de PCR para detectar *Phaeoacremonium* mostró que este último tiene una mayor sensibilidad y da resultados menos sesgados que los métodos tradicionales.

Sin embargo, el método más exitoso fue propuesto por Martín *et al.* en el año 2012, en el cual logró detectar el ADN de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* en material vegetal utilizando la qPCR. sin la necesidad de aislamiento fúngico reduciendo así el tiempo de análisis y el coste.

5.4.3. EUTIPIOSIS

Es una enfermedad crónica de la madera. En España fue diagnosticada por primera vez en el año 1979 en Badajoz (Muruamendiaraz *et al.*, 2007) desde entonces se ha extendido a la gran mayoría de viñedos españoles. La infección de Eutipiosis ocurre a través de las heridas de poda, donde el hongo coloniza los vasos del xilema y causa necrosis al producir una serie de enzimas que degradan la pared celular. Las plantas afectadas muestran pámpanos débiles, entrenudos cortos, hojas cloróticas y deformadas con necrosis, también se observa corrimiento del racimo. La madera de poda presenta un color marrón en forma de "V". Generalmente, el hongo causante de esta enfermedad es *Eutypa lata*, pero en California se ha detectado otra especie *Eutypa leptoplaca* causante de esta enfermedad (Trouillas y Gubler, 2004).

Actualmente, no existen tratamientos eficaces que erradiquen la infección de esta enfermedad, por lo que se utilizan tratamientos preventivos mediante la utilización de métodos culturales, destinados a evitar períodos en los cuales las heridas de poda sean susceptibles a la colonización, biológicos y químicos, destinados a proteger las heridas a través de efectos antifúngicos.

Uno de los métodos de biocontrol más estudiados es el uso de *Trichoderma harzianum* para el control de *Eutypa lata*. Se ha demostrado la actividad fungistática de los compuestos volátiles producidos por *Trichoderma harzianum*, así como su capacidad para inhibir el crecimiento micelar y reducir la infección (Kotze *et al.*, 2011).

En un estudio elaborado por Mutawila *et al.*, 2017 se caracterizaron los dos hongos (*Eutypa lata* y *Trichoderma*) mediante la utilización de qPCR y perfiles de metabolitos (actividades enzimáticas y contenido de polifenoles). Las muestras se trataron en autoclave y se estudió la acción de *Trichoderma* en la protección de las heridas de poda. El modelo de cultivo celular que se desarrolló en este estudio puede proporcionar un sistema simple pero confiable para estudios de expresión génica. Los diferentes patrones de expresión de los genes relacionados con la defensa (basados en la transcriptómica) podrían ser una indicación de la participación de factores de transcripción en la respuesta de la vid a hongos patógenos y no patógenos que posteriormente determinan si las interacciones darán lugar a enfermedad, resistencia o simbiosis.

Otro de las aplicaciones de las metodologías moleculares ha sido la que se refleja en el estudio desarrollado por Moisy *et al.*, en el 2017 desarrollaron un método basado por un lado en el aislamiento del hongo y uso de microscopía; por otro la utilización de la PCR tradicional y de la qPCR. Comprobaron que el aislamiento del hongo y su posterior microscopía era un proceso muy lento y daba lugar a una estimación de biomasa errónea. Y, por último, que el empleo de la qPCR, era una herramienta precisa la cual proporcionó una estimación cuantitativa de biomasa fúngica eficiente, mostrando así una correlación entre la capacidad del hongo para inducir síntomas foliares y colonizar la madera.

5.4.4. PODREDUMBRE GRIS

Botrytis cinerea es el microorganismo fúngico más relevante en la vitivinicultura ya que puede infectar a las bayas y ocasionar la conocida “Podredumbre gris o moho gris” (Keller *et al.*, 2003). Este hongo disminuye la calidad de los vinos puesto que contiene una enzima denominada lacasa que afecta a los ácidos principales como ácido tartárico y málico y a los compuestos aromáticos (La Guerche *et al.*, 2006). Nair *et al.*, en 1995, en su estudio detectaron que el primer momento de infección es en floración, seguido de un periodo de latencia en el cual el patógeno está dentro de la baya sin mostrar ningún síntoma hasta que las bayas comienzan a madurar. El control de este hongo es muy importante ya que: i) Puede funcionar como un saprófito, necrófito o parásito; ii) puede hibernar y esporular en múltiples fuentes de inóculo; iii) existen varias vías de infección; iv) pueden ocurrir con condiciones ambientales variadas, que difieren entre las vías de infección (Hill *et al.* 2014). En condiciones favorables para el hongo, produce abundantes conidios en racimo, por ello es muy importante detectar su infección de forma temprana.



Figura 10. Infección de *Botrytis cinerea* en racimo de variedad Malvasía (Fotografías tomadas en viñedo de Toro, Zamora)

Para reducir el impacto ocasionado por este hongo, los viticultores normalmente recurren a tratamientos preventivos con fungicidas de forma rutinaria campaña tras campaña. Pero la utilización de tratamientos químicos haciendo uso de fungicidas, es una práctica cada vez menos recomendada y menos aceptada. Puesto que como hemos mencionado previamente las leyes que rigen la producción de alimentos para el consumo humano y animal son cada día más rigurosas en relación a una producción agrícola segura y respetuosa con el medio ambiente y, sobre todo, porque estos tratamientos químicos pueden estar en la cadena alimentaria y provocar graves problemas en la salud de los consumidores.

Por ello, se han desarrollado métodos alternativos a los fungicidas, como la aplicación de microorganismos antagónicos, la aplicación de sustancias antimicrobianas naturales para controlar el desarrollo de la enfermedad y la cantidad de esporas, y la utilización de técnicas moleculares para identificar de forma más precisa y precoz su aparición. Estos aspectos han atraído la atención y el interés de numerosos investigadores para caracterizar las poblaciones del patógeno en distintas regiones del planeta.

Los estudios dirigidos a identificar y detectar de forma precoz este hongo han seguido el modelo histórico de la evolución del uso de los diferentes tipos de marcadores moleculares descritos en el apartado 5.1. Técnicas moleculares disponibles para la identificación y caracterización del microbioma de la vid. Así, los primeros estudios llevados a cabo con marcadores moleculares en *Botrytis cinerea* datan de principios de los 90, en ellos se analizaron marcadores de tipo RAPD. En 1993 Van de Vlugt-Bergmans *et al.*, publicaron un trabajo centrado en la caracterización y diferenciación de *Botrytis cinerea* de una pequeña colección de aislados de campo recogidos en Holanda y su comparación con las dos cepas de referencia de esta especie SAS56 y SAS405. Con un número reducido de marcadores fue posible diferenciarlos todos ellos entre sí y con las cepas de referencia de manera inequívoca, resultando llamativo el hecho de que dos cepas recogidas con un intervalo de tiempo de 4 años y a partir de huéspedes diferentes sólo difirieran en un marcador. En el año 2000 en España, Alfonso *et al.*, realizaron un estudio sobre 40 aislados recogidos en invernaderos del sur del país, comprobando que la población en su conjunto era muy heterogénea, mostrando muy poca diferenciación de las subpoblaciones de los diferentes invernaderos.

En el estudio elaborado por Diguta *et al.*, 2010, se concluye que la cantidad de esporas que se producen antes de la introducción de técnicas moleculares, permitían identificar y cuantificar la población del hongo mediante microscopía óptica, pero es una técnica que requiere tiempo, experiencia para la identificación precisa de las esporas y tiene un límite de detección bajo (Hunter *et al.*, 2009). También muchos patógenos están enmascarados por el crecimiento de hongos de crecimiento más rápido (Martínez *et al.*, 2010). Por ello cada vez más se están utilizando técnicas moleculares para la identificación de esporas, basadas en métodos derivados de la PCR (West *et al.*, 2008), sin embargo, esta cuantificación no es muy precisa. Por lo que para evaluar la presencia de esporas específicas con mayor precisión se utilizan técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Luo *et al.*, 2010), esta técnica es específica para la detección y contaminación de *Botrytis cinerea* en uvas y así optimizar el uso de fungicidas.

La introducción de qPCR ha proporcionado un mecanismo para detectar y cuantificar simultáneamente ADN de organismos específicos (Park *et al.*, 2011). Los métodos de detección basados en PCR son rápidos, sensibles y confiables en comparación con el análisis convencional de microscopía óptica, y a menudo más sensibles que las técnicas de inmunodetección (Diguta *et al.*, 2010). Compuestos orgánicos como polifenoles y polisacáridos presentes en los tejidos vegetales pueden inhibir o potenciar la amplificación por PCR (Varma *et al.*, 2007). En el estudio elaborado por Saito *et al.*, en 2013 establecen que la aplicación de qPCR, se ha desarrollado como una aplicación para evaluar el riesgo de la enfermedad la cual proporciona una alternativa a las técnicas de detección visual y cultural. El estudio más reciente ha sido realizado por Ammour *et al.*, en el 2019, este estudio está basado en el procedimiento desarrollado por Saito *et al.*, en 2013, en el que se introducen algunas adaptaciones con respecto al manejo del material vegetal antes de la extracción de ADN. En dicho ensayo compararon la utilización de qPCR con las técnicas micológicas tradicionales para cuantificar *Botrytis cinerea* en función de la colonización y la esporulación en racimos. Concluyendo así una vez más que los métodos tradicionales llevan mucho tiempo, mientras que el ensayo de qPCR tarda aproximadamente de 3 a 4 horas, y proporciona resultados sensibles, específicos y confiables.

6. CONCLUSIONES

El estado sanitario de los viñedos debe ser controlado para garantizar la calidad del viñedo y su posterior proceso de vinificación.

Las técnicas de identificación molecular son herramientas de investigación potentes para estudios biológicos, que pueden aplicarse a la detección de enfermedades incluso antes de la aparición de síntomas, evitando así la posible propagación de patógenos y dando lugar a definir estrategias específicas y eficaces en cada caso.

El uso correcto de estas técnicas permite ahorrar grandes cantidades de dinero derivadas del uso indistinto de insumos y las enormes pérdidas ocasionadas por la muerte del viñedo y su posterior reemplazo, como ya se ha puesto de manifiesto en los estudios publicados

Actualmente, como ya hemos comentado, en el mundo de la viticultura y enología sobre el uso de estas técnicas y su interés en el mundo de la enología, aún hay un gran desconocimiento pero cabe destacar que cada vez más se están empleando técnicas moleculares para determinar la presencia/ausencia de microorganismos con las condiciones sanitarias y productivas del viñedo. Sin embargo, algunos microorganismos y empresas como Biomemakers tienen registrados una serie de resultados que han sido publicados como “Casos de éxito de 2017”.

La mejora de estas técnicas y su accesibilidad conllevará el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio completo de los suelos vitícolas y a su vez proporcionaran la información necesaria para los enólogos para realizar un control estricto sobre las enfermedades fúngicas de madera presentes y su posterior control así como sobre las poblaciones de microorganismos presentes durante la elaboración de vinos, que no eran sujeto de la presente revisión bibliográfica, pero cuyo abordaje es similar al descrito.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbasian F., Lockington R., Megharaj M., Naidu R. The integration of sequencing and bioinformatics in metagenomics. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2015;14 ;357-383.

Alfonso, C., Raposo, R., Melgarejo, P. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology.* 2000; 49, 243–251

Ammour S. M., Fedele G., Morcia C., Terzi V., Rossi, V. Quantification of *Botrytis cinerea* in Grapevine Bunch Trash by Real-time PCR. *Phytopathology.* 2019.

Aroca A., Raposo R. PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007; 73: 2911–2918.

Agustí-Brisach C., Gramaje D., García-Jiménez J., Armengol J. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology.* 2013; 137(1): 103–112.

Agustí-Brisach C., Mostert L., Armengol J. 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.* 2014; 63: 316–322.

Azofeifa-Delgado A. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana.* 2006; 17(2): 221–242.

Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo S. I., Gupta, R. Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology.* 2015; 6(1): 435–462.

Bavaresco L., Bertamini M., Iacono F. Lime-induced chlorosis and physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot blanc) leaves. *Vitis.* 2006; 45(1) :45–46

Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., et al. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules.* 2017; 22 (2): 189.

Belda I., Zarraonaindia I., Perisin M., Palacios A., Acedo, A. From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 821.

Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., et al. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol.* 2013; 62; 243–265.

BiomeMakers (<https://biomemakers.com/>)

Bokulich, N. A., Lewis, Z. T., Boundy-Mills, K., and Mills, D. A. A new perspective on microbial landscapes within food production. *Biotechnol.* 2016; 37: 182–189.

Cococlin L., Alessandria V., Dolci P., Gorra R., Rantsiou K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Food Microbiol.* 2013; 167; 29-43.

Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization mechanisms involved and prospect for utilization. *Soil Biology & Biochemistry.* 2010; 42; 669–678.

- Di Marco S., Mazzullo A., Calzarano F., Cesari A. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39: 232–240
- Diguta, C. F., Rousseaux, S., Weidmann, S., Bretin, N., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 313:81–87.
- Edwards C.J., Welch S.R., Chamberlain J., Hewson R., Tolley H., Cane P.A. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *J Clin Virol.* 2007; 39: 271–275.
- FAO (Organización de Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación). 2003.
- Fillion M., Jabaji S., St-Arnaud M. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Mycorrhizal Bean Plants and Surrounding Mycorrhizosphere Soil Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Direct Isolations on Selective Media. *Phytopathology*. 2003; 92(2): 229–235.
- Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016; 17: 333–351.
- Gramaje D., Moster L., Armengol J. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathol. Mediterr.* 2011; 50: 112–126.
- Grasso S., Magnano di San Lio G. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis*. 1975; 14: 36–39.
- Halleen F., Schroers H.J., Groenewald J.Z. y Crous P.W. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black-foot disease of grapevines (*Vitis* spp). *Studies in Mycology*. 2004; 50, 431– 455.
- Halleen F., Schroers H.J., Groenewald J.Z., Rego C., Oliveira H., Crous P.W. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology*. 2006; 55: 227–234.
- Halleen F., Fourie P.H., Crous P.W. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*. 2007; 56: 637–645
- Hill, G. N., Evans, K. J., Beresford, R. M., Damberg, R. G. Comparison of methods for the quantification of botrytis bunch rot in white wine grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2014; 20:432-441.
- Holland T.C., Bowen P., Bogdanoff C., Hart M.M. How distinct are arbuscular mycorrhizal fungal communities associating with grapevines? *Biology Fertility Soils*. 2014; 50(2): 667–674.
- Kaplan, J., Travadon, R., Cooper, M., Hillis, V., Lubell, M., and Baumgartner, K. Identifying economic hurdles to early adoption of preventative practices: The case of trunk diseases in California winegrape vineyards. *Wine Economic and Policy*. 2016; 5 (2): 127-141.
- Kchouk M., Gibrat J. F., Elloumi, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017; 9.
- Keller M., Viret O., Cole F. M. *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *Phytopathology*. 2003; 93(3): 316–322.

- Khalil H.A. Influence of Vesicular-arbuscula Mycorrhizal Fungi (*Glomus* spp.) on the Response of Grapevines Rootstocks to Salt Stress. *Asian Journal of Crop Science*. 2013; 5(4): 393–494.
- Kohler J., Hernández J.A., Caravaca F., Roldán A. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*. 2008; 35(2):141–151.
- Kotze C., van Niekerk J., Halleen F., Fourie P.H. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; 50: 247–263.
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schüßler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 2009; 183: 212–223.
- Lardner r., Stummer B.E., Sosnowski M.R., Scott E.S. Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*. 2005; 109(5): 799–808.
- Larignon P., Gianetto K., Salancon E., Girardon K., Berud F., Jacquet O., Coarer M. Champignons associés aux maladies du bois: une enquête en pépinières. *Institut Français de la Vigne et du Vin*. 2008; 3: 26–31.
- La Guerche S., Dauphin B., Pons M., Blancard D., Darriet P. Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(24): 9193–9200.
- Likar, M., Hančević, K., Radić, T., Regvar, M. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast. *Mycorrhiza*. 2012; 23 (3): 209–219.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic*. 1995;4: 357–362.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. 2001; 25(4): 402–408.
- Llorens V., Martín M.P., Hidalgo E. PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrízicos. *Revista Catalana Micol*. 1997; 20: 187–198.
- Luo Y., Gao W., Doster M., Michailides T.J. Quantification of conidial density of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil from almond orchards using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 106: 1649–1660.
- Maluta D.R., Larignon P. Pied-noir: Mieux vaut prevenir. *L’Institut Français de la Vigne et du Vin*. 1991
- Marchesei J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015; 3: 31.
- Mardis E.R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2008; 9: 387–402.
- Martín M.T., Cobos R., Martín L., López-Enríquez L. Real-Time PCR Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(11): 3985–3991.

Martinez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus* larvae vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Letters in Applied Microbiology*. 2010; 50: 603–610

MAPAMA (<https://www.mapa.gob.es/>)

Moisy C., Berger G., Flutre T., Le Cunff L., Péros, J.P. Quantitative Assessment of Grapevine Wood Colonization by the Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Journal of Fungi*, 2017; 3(2):21.

Morgan HH., Du Toit M., Selati M.E., The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. *Front Microbiol*. 2017; 8.

Mugnai L., Graniti A., Surico G. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*. 1999; 83, 404–416.

Mullis K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. 1990; 262(4): 56–65.

Muruamendiaraz A., Iturritxa E., Legorburu F.J. Foliar symptoms of *Eutypa dieback* are consistent over years and vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46: 122–123.

Mutawila C., Stander C., Halleen F., Vivier M. A., Mostert, L. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Eutypa lata* and *Trichoderma atroviride* culture filtrates: expression of defence-related genes and phenotypes. *Protoplasma*. 2017; 254(2): 863–879

Nair, N., Guilbaud-Oulton, S., Barchia, I., Emmett, R. Significance of carry over inoculum, flower infection and latency on the incidence of *Botrytis cinerea* in berries of grapevines at harvest in New South Wales. *Australian Journal of Experimental -Agriculture*. 1995; 35:1177–1180.

OIV. Aspectos de la coyuntura mundial. 2017 (abril).

OIV. Códigos de buenas prácticas. 2005.

Olmos A., Yuste A., Torres LB., Bertolini E., Wetzel E., Lopez-Fabuela I., *et al.*, Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *Journal of virological methods*. 2010;188: 21–24.

Overton B., Stewart E.L., Wenner N., Qu X. Qualitative real-time PCR SYBR® Green detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(3): 403–410.

Pareek C. S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*. 2011; 52(4), 413–435.

Park S.H., Hanning I., Jarquin R., Moore P., Donoghue D.J., Donoghue A.M. Ricke S.C. Multiplex PCR for detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 316: 7–15.

Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, K., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E. *Cylindrocarpum* species associated with black-foot of grapevine in Northeastern United States and Southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2011; 62 (2): 177–183.

Pinto C., Pinho D., Sousa S., Pinheiro M., Egas C., *et al.* Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e85622.

- Pinto C., Gomes A.C. *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*. 2016; 61(3): 243–56.
- Pollastro S., De Miccolis Angelini R.M., Abbatecola A., Dongiovanni C., Natale P., Carlucci A., Faretra F. Compatibilità vegetativa in *Phomopsis viticola*, agente causale dell'escoriosi o necrosi corticale della vite. *Atti XIV Convegno Nazionale di Micologia*, Ottobre 22–27. 2001..
- Reuter J.A., Spacek D.V., Snyder M.P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*. 2015; 58 (4): 586–597.
- Reynolds A.G. *Managing wine quality: viticulture and wine quality*. Science, Elsevier. 2010.
- Rothberg J. M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Bustillo J., et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011; 475: 348–352.
- Saito S., Dunne K. J., Evans K. J., Barry K., Cadle-Davidson L., Wilcox W. F. Optimisation of techniques for quantification of *Botrytis cinerea* in grape berries and receptacles by quantitative polymerase chain reaction. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2013; 19: 68-73.
- Schreiner R.P., Mihara K.L. The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia* 2009; 101(5): 599–611.
- Smith S.E., Facelli E., Pope S., Andrew Smith F. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 2010; 326: 3–20.
- Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol*. 2011; 156: 1050–1057.
- Spinosi J., Févotte J., Vial G. Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. *Santé travailin*. Institut de Veille Sanitaire. 2009; 1–20.
- Sosnowisky M.R., Wicks T.W., Scott E.S. Controlling *Eutypa dieback* by remedial surgery. *Phytopathologia Mediterranea*. 2010; 49: 125.
- Surico G., Mugnai L., Marchi G. Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45: 68–86
- Sweeney, M., Dobson A.D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 2018; 43(3): 141–158.
- Trouvelot S., Bonneau L., Redecker D., Tuinen D Van., Adrian M., Wipf D. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2015 ;35: 1449–1167.
- Trouillas F.P., Gubler W.D. Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen of grapevine in Northern California. *Mycological Research*. 2004; 108: 1995–1204.
- UE (Unión Europea): Reglamento (CE) N° 128/2009 de la comisión de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

UE (Unión Europea): Reglamento (CE) N° 396/2005 de la comisión de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.

UE (Unión Europea): Reglamento (CE) N° 834/2007 de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/9.

UE (Unión Europea): Reglamento (CE) N° 203/2012 de 8 de marzo de 2012 que modifica el Reglamento (CE) no 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 834/2007 del Consejo, en lo que respecta a las disposiciones de aplicación referidas al vino ecológico.

Universidad de Córdoba. Fichas técnicas, procedimientos experimentales y metodologías ofrecidas a nuestros usuarios. Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI). 2016

Úrbez-Torres J. R., Haag P., Bowen P., y O’Gorman D. T. Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with black foot disease of grapevine. *Plant Disease*. 2014; 98:456–468.

Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Van’t Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M. Van Kan, J. A. L. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*. 1993; 97: 1193–1200.

Varma A., Padh H., Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*. 2007; 2: 386–392.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(21): 4407–4414.

Wang ZK., Yang Y.S., Stefka A.T., Sun G., Peng L.H. Review article: fungal microbiota and digestive diseases. *Aliment Pharmacol*. 2014; 39, 751–766.

West J.S., Atkins S.D., Emberlin J., Fitt B.D.L. PCR to predict risk of airborne disease. *Trends Microbiol*. 2008; 16: 380–387.

Williams J.G.K., Kubilik A.R., Livak K.L., Rafaski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18: 6531–6535.

WineSeq (<https://wineSeq.com>)

Witter C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen A.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997; 22: 130–138.