

Identificación de hongos patógenos de madera de vid de la familia Botryosphaeriaceae mediante PCR-RFLP

L. García Martín, A. Mena Morales, P.M. Izquierdo Cañas* (Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha. Tomelloso (Ciudad Real) *email: pmizquierdo@jccm.es).

P. M. Izquierdo Cañas (Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Albacete).

En este trabajo se presentan los resultados del análisis de 160 muestras de madera de vid procedentes de viñedos de Castilla-La Mancha que presentaban síntomas de decaimiento. De los 2.000 hongos patógenos aislados, casi un 60% corresponden a hongos de la familia Botryosphaeriaceae. En mucha menor proporción se han aislado *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y especies de *Cylindrocarpon* y *Phomopsis*. Por PCR-RFLP se han identificado algunos hongos de la familia Botryosphaeriaceae previamente identificados por métodos clásicos y se ha comprobado que esta técnica molecular, sirve de gran ayuda para diferenciar los distintos géneros pero no es válida para diferenciar especies dentro del mismo género.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades relacionadas con hongos patógenos de madera de vid ha aumentado considerablemente en los últimos años (MARTÍN *et al.*, 2007). Estas enfermedades muestran síntomas muy variables, que van desde la muerte súbita de las cepas en verano o el marchitamiento de brazos, tallos, brotes, hojas y bayas (MUGNAI *et al.*, 1999). Las heridas de poda (LARIGNON y DUBOS, 1997) o su introducción en el material de propagación de plantas madres o el injerto (AROCA *et al.*, 2006) es la fuente de transmisión.

Distintos hongos patógenos están implicados en estas enfermedades de madera de vid, entre ellos los aislados de la familia Botryosphaeriaceae (TORRES *et al.*, 2009). *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* se aíslan frecuentemente, y se han descrito como los responsables de la enfermedad de Petri (SCHECK *et al.*, 1998) y la yesca (SURICO *et al.*, 2006) aislándose conjuntamente con Botryosphaeriaceae (NIEKERK *et al.*, 2006). *Cylindrocarpon* spp se aísla en las raíces de viñas jóvenes (TORRES *et al.*, 2009) y se consideran responsables de la enfermedad de pie negro (ALANIZ *et al.*, 2007).

Hasta hace pocos años la identificación de estos hongos se realizaba por métodos clásicos basados en la observación del micelio en placa, su textura, y la observación al microscopio de las estructuras características de cada especie, así como la morfología de esporas y células conidiogénicas (ARMENGOL *et al.*, 2001). Esta metodología es lenta, y en muchas ocasiones no permite una clasificación definitiva. Muchas especies poseen características tan similares que las hacen morfológicamente indistinguibles. Por otro lado, una misma especie puede adoptar distintas morfologías en un mismo medio de cultivo en función de condiciones no siempre controlables (COBOS, 2008).

En la familia Botryosphaeriaceae además se incluyen distintos géneros de hongos patógenos, cuyas características morfológicas se superponen muchas veces (PITT *et al.*, 2010). Todos se caracterizan por un rápido crecimiento en placa Petri con una formación de esporas muy lenta (ARMENGOL *et al.*, 2001) que dificulta su identificación por métodos clásicos.

La amplificación del ADN fúngico por PCR de la región ITS1-ITS4 y la digestión del amplificado mediante endonucleasas de restricción puede permitir una identificación rápida de estos hongos patógenos (ALVES *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo es identificar mediante PCR-RFLP algunos de los hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae aislados en muestra de madera de vid que presentaban en campo síntomas externos de decaimientos.

Material y métodos

Aislamientos de los hongos

Los aislamientos se realizaron a partir de 160 muestras de madera de vid de distintas variedades de uva, recibidas en nuestro centro entre los años 2008 a 2010. Para su aislamiento se siguió la metodología descrita por Larignon y Dubos (1997).

Identificación morfológica

La identificación de los aislados a nivel de género y especie se realizó por la observación directa del cultivo bajo lupa y microscopio y por sus características de esporulación (ARMENGOL *et al.*, 2001).

Identificación molecular mediante PCR-RFLP

Extracción ADN

El ADN genómico de los hongos se aisló a partir de micelio fresco crecido en medio PDA utilizando DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante.

Amplificación ADN

Para la amplificación del ADN se utilizaron los oligonucleotidos universales ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador GENE AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 50µl conteniendo 2µl (20 a 60 ng) de ADN fúngico, 0,5 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs y 1U Tag DNA polimerasa (Biotools). Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización a 95 °C 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C 30 segundos, hibridación a 58 °C 30 segundos y extensión a 72 °C 1 minuto, y una extensión final a 72 °C 7 minutos. La separación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1,5 % en TBE 0,5 X a 100 V, visualizándose con luz ultravioleta tras la tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron (GelDoc 1000, Bio-Rad).

Digestión amplificado ADN

Tras la amplificación con los oligonucleotidos iniciadores ITS1 e ITS4 se procedió a la digestión de dicho fragmento con las endonucleasas de restricción Hpa II, Alu

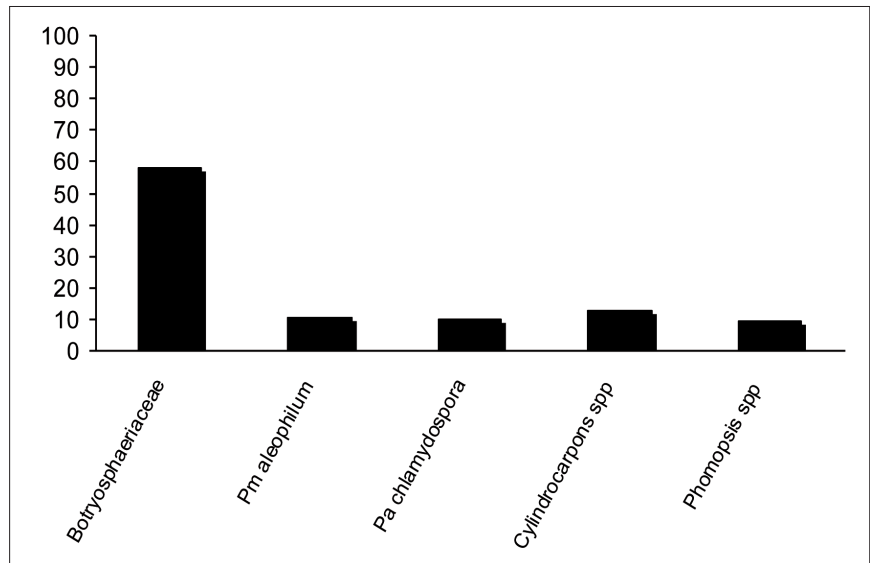


Figura 1. Porcentaje de cada una de los hongos patógenos identificados en muestras de madera de vid.

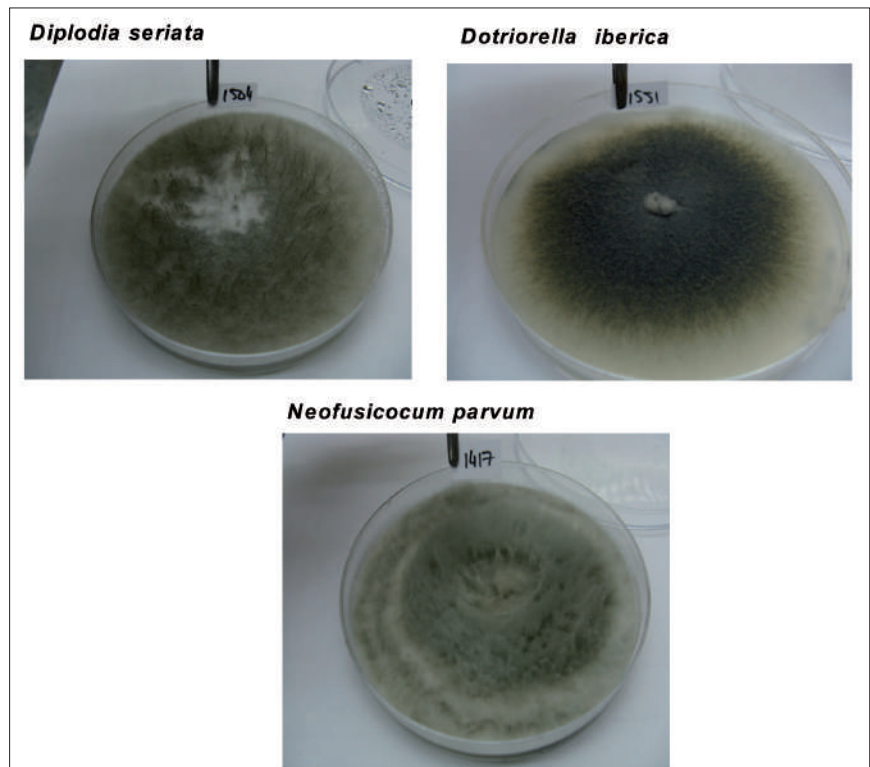


Figura 2. Crecimiento del micelio en placas de agar PDA de algunos de los hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae identificados en madera de vid.

I y Mbo I (Izasa, Barcelona, España). Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl conteniendo 8 µl de fragmento a digerir, 5U de enzima y 1X tampón según las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C 24 horas.

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando TBE 0,5 X a 100 V. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (Sigma).

TRADECORP
ESPAÑA



evolución

protección & nutrición
Una combinación perfecta

www.tradecorp.es

Tradecorp

C/ Alcalá 498 - planta 3ª • 28027 Madrid - España • Tel. +34 91 327 29 30 - Fax +34 91 304 42 00

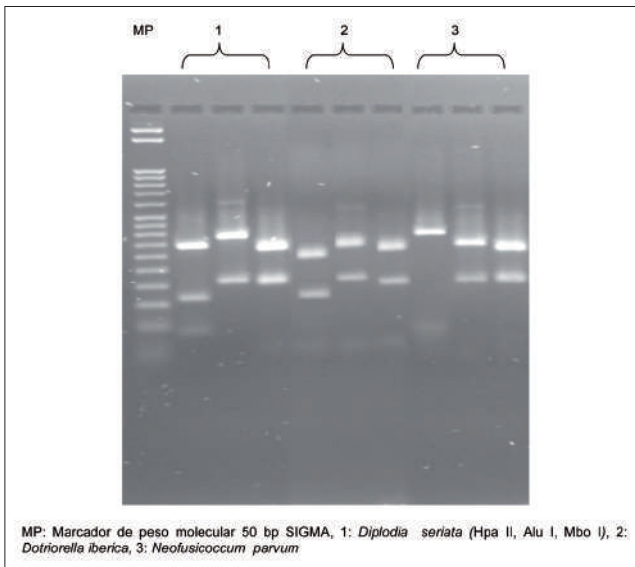


Figura 3. Perfiles PCR-RFLP obtenidos con las enzimas de restricción Hpa II, Alu I y Mbo I de algunos de los hongos patógenos de madera de vid pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae.

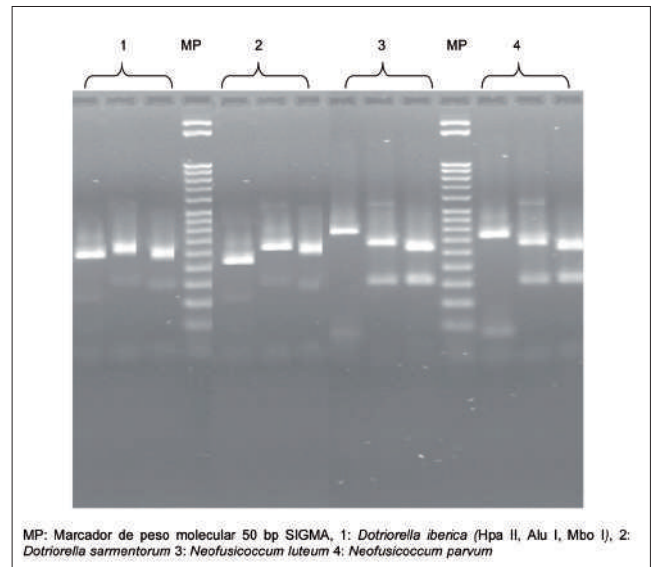


Figura 4. Perfiles PCR-RFLP de *Dothiorella iberica*, *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum luteum* y *Neofusicoccum parvum*.

Cepas de referencia

Para la identificación molecular de cada uno de los aislados se utilizaron cepas de la colección de hongos CBS (Utrecht, Países Bajos) que se emplearon como referencia para la comparación de los patrones de restricción.

Resultados y discusión

En la **Figura 1** se muestra el porcentaje de cada uno de los hongos identificados del total de 2000 aislados obtenidos. De todos los hongos patógenos identificados destacan en importancia los pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae. También han sido identificados aunque en mucho menor proporción *Phaeoacreomium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamyospora* y especies de *Cylindrocarpon* y *Phomopsis*.

Entre los hongos patógenos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae se han identificado por métodos clásicos *Diplodia seriata* y especies de los géneros *Dothiorella* y *Neofusicoccum*. En la **Figura 2** se muestra el micelio característico en agar PDA de estos hongos patógenos. Todos presentan un micelio blanquecino algodonoso que invade toda la superficie del medio de cultivo y que a medida que envejece se va oscureciendo hasta tonos verdes grisáceos e incluso negruzcos (HUERTAS *et al.*, 2010).

Diplodia seriata anamorfo de *Botryosphaeria obtusa* (PHILLIPS *et al.*, 2007) se incluye dentro del género *Diplodia*, junto a *Diplodia mutila*

Identificación	Amplificado (pb)	Fragmentos de restricción (pb)		
		Hpa II	Alu I	Mbo I
<i>Diplodia seriata</i>	600	345, 170, 90	390, 215	340, 215
<i>Dothiorella iberica</i>	590	285, 170	350, 215	340, 200
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	600	285, 170	350, 215	340, 200
<i>Neofusicoccum luteum</i>	610	400, 90	325, 210	325, 215
<i>Neofusicoccum parvum</i>	600	400, 90	325, 210	325, 215

Tabla 1. Tamaños en pares de bases (pb) del amplificado PCR con los oligonucleótidos ITS1/ITS4 y fragmentos de restricción obtenidos mediante PCR-RFLP con las endonucleasas de restricción Hpa II, Alu I y Mbo I respectivamente.

(CROUS *et al.*, 2006), no identificado en nuestros aislados y sí por otros autores en muestras de vid (MARTIN y COBOS, 2007).

Dentro del género *Dothiorella* se han identificado *Dothiorella iberica* y *Dothiorella sarmentorum*, aislados en baja proporción en viñas jóvenes (AROCHA *et al.*, 2006).

Los aislados del género *Neofusicoccum* han sido identificados como *Neofusicoccum luteum* y *Neofusicoccum parvum*. *Neofusicoccum parvum* conocida como *Botryosphaeria parva* suele aislarse en baja proporción en viñas jóvenes, y fue descrita por primera vez en viñas españolas por Aroca *et al.*, 2006, aislándose habitualmente junto a *Diplodia seriata* (NIEKERK *et al.*, 2006).

Mediante PCR-RFLP se han identificado estos aislados de Botryosphaeriaceae en base a los patrones de restricción del amplicón ITS1/ITS4 (aproximadamente 600 pb) obtenidos con las endonucleasas Hpa II, Alu I y Mbo I (**Tabla 1**).

Hpa II y Alu I permitió diferenciar los distintos géneros dentro de la familia Botryosphaeriaceae. Los aislados identificados como *Diplodia seriata* presentan tres bandas específicas a 345, 170 y 90 pb con Hpa II, que los distinguen del resto de aislados de Botryosphaeriaceae identificados en este trabajo (**Figura 3**). Los aislados del género *Dothiorella* presentan dos fragmentos de restricción con Hpa II a 285 y 170 pb, que los distingue de los pertenecientes al género *Neofusicoccum* que

también presentan dos fragmentos de restricción con Hpa II pero con tamaños distintos 400 y 90 pb.

Alu I también es válida para diferenciar *Diplodia seriata* de especies de los géneros *Dotriorella* y *Neofusicocum* (Figura 3). Tanto *Diplodia seriata* como los aislados de los géneros *Dotriorella* y *Neofusicocum* presentan dos fragmentos de restricción con Alu I. En el caso de *Diplodia seriata* el de mayor tamaño es de 390 pb a diferencia de *Dotriorella* 350 pb y *Neofusicocum* 325 pb.

Los perfiles de restricción con Mbo I para *Diplodia seriata* y especies del género *Dotriorella* son idénticos, bandas específicas a 340 y 215 pb, que hace imposible su diferenciación por esta técnica molecular. *Neofusicocum* presenta también dos bandas pero la primera de ellas de menor tamaño 325 pb.

En la Figura 4 se muestran los perfiles de restricción obtenidos con las tres endonucleasas (Hpa II, Alu I y Mbo I) para las especies identificadas de *Dotriorella* (*Dotriorella iberica* y *Dotriorella sarmentorum*) y *Neofusicocum* (*Neofusicocum luteum* y *Neofusicocum parvum*).

Mediante PCR-RFLP con estas enzimas los aislados de la familia *Dotriorella* y *Neofusicocum* tuvieron idénticos perfiles lo que hace imposible diferenciar *Dotriorella iberica* de *Dotriorella sarmentorum*, así como *Neofusicocum luteum* de *Neofusicocum parvum* mediante esta técnica molecular. Cobos, 2008 empleando otras enzimas de restricción tampoco diferenció *Dotriorella iberica* de *Dotriorella sarmentorum*.

Conclusiones

Mediante PCR-RFLP se han identificado algunos hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae previamente identificados por métodos clásicos y se ha comprobado que esta técnica molecular, con las endonucleasas Hpa II, Alu I y Mbo I sirve de gran ayuda para diferenciar los distingos géneros pero no es válida para diferenciar especies dentro del mismo género.

Abstract

This paper shows the results of the analysis of 160 samples of grapevine diseases in Castilla-La

Mancha caused by fungal pathogens. Of the 2000 fungal pathogens isolated, almost 60% are fungal family Botryosphaeriaceae. In minor proportion others pathogenic fungi were identified as *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* and species of *Cylindrocarpon*, and *Phomopsis*. PCR-RFLP some fungi have been identified Botryosphaeriaceae family previously identified by classical methods and bought this molecular technique is very helpful to differentiate the genus distinction but it is valid to differentiate species within the genus.

Palabras clave: Botryosphaeriaceae, Enfermedades de madera vid, PCR-RFLP

Agradecimientos: Al Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos de la Universidad Politécnica de Valencia por su colaboración y ayuda en la identificación morfológica de los aislados. P. M. Izquierdo agradece al Fondo Social Europeo y a INCRECYT la cofinanciación de su contrato.

BIBLIOGRAFÍA

- ALANIZ, S., LEÓN, M., VICENT, A., GARCÍA JIMÉNEZ, J., ABAD, P. ARMENGOL, J. 2007. *Characterization of Cylindrocarpon species associated with black foot disease of grapevine in Spain*. Plant Disease, 91: 1187-1193.
- ALVES A., PHILLIPS J. L., HENRIQUES I. AND CORREIA, A. 2005. *Evaluation of amplified rDNA restriction analysis as a method for the identification of Botryosphaeria species*. F.E.M.S. Microbiology Letters 245: 221-229.
- ARMENGOL, J., VICENT, A., TORNÉ, F., GARCÍA-FIGUERES, F., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2001. *Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey*. Phytopathologia Mediterranea, 40: 325-329. AROCA, A., GARCÍA-FIGUERES, F., BRACAMONETE, L., LUQUE, J., RAPOSO, R. 2006. *A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain*. European Journal of Plant Pathology, 115 (2): 195-202.
- COBOS, R. 2008. *Los decaimientos de la vid en Castilla y León: Aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de madera de vid (Nitis vinifera)*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- CROUS P.W., B. SLIPPERS, M.J. WINGFIELD, J. RHEEDER, W.F.O. MARASAS, A. J. L. PHILIPS, A. ALVES, T. BURGESS, P. BARBER AND J. Z. GROENEWALD. 2006. *Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae*. Studies in Mycology 55: 235-253.
- HUERTAS, B., FERNÁNDEZ, M., IZQUIERDO, P. M. 2010. *Descripción de los hongos patógenos de madera de vid aislados más frecuentemente en viñas de Castilla-La Mancha*. Enoviticultura, 4: 4-9.
- LARIGNON, P., DUBOS, B. 1997. *Fungi associated with esca disease in grapevine*. European Journal of Plant Pathology, 103: 147-157.
- MARTIN, M. T., COBOS, R. 2007. *Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain)*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 18-25.
- MUGNAI, L., GRANITI, A., SURICO, G. 1999. *Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines*. Plant Disease, 83: 404-418.
- NIEKERK, J. M., FOURIE, P. H., HALLEEN, F., CROUS, P. W. 2006. *Botryosphaeria spp. as grapevine trunk disease pathogens*. Phytopathologia Mediterranea, 45: 43-54.
- PHILLIPS A.J.L., P.W. CROUS, ALVES, A. 2007. *Diplodia seriata the anamorph of "Botryosphaeria" obtusa*. Fungal Diversity 25, 181-195.
- PITT, W. M., HUANG, R., STEEL, C. C., SAVOCCHIA, S. 2010. *Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 16: 258-271.
- SHECK, H. J., VÁZQUEZ, S. J., FOGLE, D., GUBLER, W. D. 1998. *Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline*. California Agriculture, 52 (4): 19-23.
- SURICO, G., MUGNAI, L., MARCHI, G. 2006. *Older and recent observation on esca: a critical overview*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S68-S86.
- TORRES, R., FERNÁNDEZ, M., CHACÓN, J. L., IZQUIERDO, P. M. 2009. *Hongos asociados a las enfermedades de madera de vid en la variedad Syrah*. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, Vol. 35 (4).
- WHITE T.J., T. D. BRUNS, S. LEE AND J.W TAYLOR, 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (M. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA, 315-322.