



Afección de pie negro en la base del portainjerto de vid.

María del Pilar Martínez-Diz^{1,2}, Emilia Díaz-Losada¹, Mónica Berbegal³, Marcos Andrés-Sodupe⁴ y David Gramaje⁴

¹ Estación de Viticultura e Enología de Galicia (AGACAL-EVEGA), Leiro, Ourense.

² Universidade da Coruña, Facultade de Ciencias, Campus da Zapateira, A Coruña.

³ Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Valencia.

⁴ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de la Rioja, Gobierno de La Rioja, Logroño.

Variaciones espaciales en las comunidades fúngicas en suelos de viñedos y su interacción con la enfermedad del pie negro

El conocimiento de las interacciones que se producen entre el microbioma presente en el suelo, en la rizosfera y la colonización de las raíces de las vides puede resultar clave para determinar los procesos de infección por hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid (EMV), principalmente la enfermedad del pie negro. Por ello, en este estudio se evaluó, en primer lugar, los cambios en la dinámica de las comunidades fúngicas del suelo, la rizosfera y la endorizosfera en cinco viñedos jóvenes de La Rioja mediante secuenciación masiva de amplicones de la región ITS2 con el sistema MiSeq de Illumina. Además, se cuantificaron los hongos asociados al pie negro mediante la puesta a punto de un protocolo innovador de cuantificación absoluta basado en la tecnología de la droplet digital PCR (ddPCR), comparando su eficiencia y sensibilidad con el sistema de cuantificación relativa de PCR a tiempo real (qPCR). Las comunidades fúngicas del suelo, su diversidad y composición se vieron afectadas en gran medida por el compartimento suelo-planta, mientras que la variación de las mismas entre viñedos fue baja. Las raíces de vides asintomáticas mostraron ser un nicho microbiano habitado por hongos asociados a las EMV, lo que abre nuevas perspectivas en el estudio del papel endofítico de estos patógenos en la vid. Los resultados de la cuantificación de hongos asociados al pie negro mediante ambas técnicas mostraron una correlación significativa, si bien la ddPCR fue la técnica más sensible y precisa en la detección de bajas concentraciones. Ambas técnicas mostraron que la abundancia de hongos asociados al pie negro no se vio afectada por los distintos compartimentos suelo-planta.

Palabras clave: droplet digital PCR; microbioma; pie negro; secuenciación masiva.

Las interacciones que se producen en la rizosfera, entre la vid y los patógenos fúngicos habitantes del suelo son hasta la fecha desconocidas. La rizosfera es el lugar de infección donde los patógenos del suelo establecen una relación parasitaria con la planta. Para infectar el tejido de la raíz, éstos tienen que competir con otros microorganismos por los nutrientes y/o espacio disponible. Una de las patologías de la vid, la enfermedad del pie negro, que contribuye al síndrome del decaimiento en viñedos jóvenes (Gramaje y Armengol, 2011), está asociada a especies fúngicas habitantes comunes del suelo. Diversas especies pertenecientes a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria*, *Pleiocarpon* y *Theλονectria* han sido asociadas con esta enfermedad (Gramaje y col., 2018). Estos hongos producen clamidosporas que les permiten sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el suelo (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). La infección puede ocurrir a través de pequeñas heridas producidas en las raíces durante el proceso de plantación, por la formación incompleta del callo o bien en heridas producidas en el proceso de propagación, como el desyemado, desde las que la infección avanza hacia la base del portainjerto (Halleen y col., 2006).

Tradicionalmente, la detección e identificación de hongos presentes en el suelo se ha realizado mediante evaluaciones morfológicas dependientes del cultivo en placa. Estas técnicas, aunque son fiables para una identificación y clasificación preliminar, no son capaces de detectar bajos niveles del patógeno, ni tampoco identifican a la gran mayoría de los microorganismos presentes. Las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), y dentro de estas fundamentalmente la secuenciación masiva de amplicones, han supuesto un avance en el conocimiento de las comunidades microbianas y sus funciones en la interfaz suelo-raíz. El tipo de suelo y el genotipo del huésped han sido identificados como factores principales que condicionan el microbioma de la rizosfera (Bernal y col., 2019a). La PCR a tiempo real (qPCR) se ha convertido en una técnica útil para la cuantificación

relativa de hongos patógenos en suelo, sin embargo, de la tecnología droplet digital PCR (ddPCR) ha emergido como una técnica novedosa y más sensible que la qPCR, capaz de cuantificar de forma absoluta el organismo diana de muestras ambientales (Hindson y col., 2011).

En este contexto, comprender las variaciones espaciales de las comunidades fúngicas de los compartimentos suelo-planta, y de manera particular cuantificar los hongos asociados al pie negro, proporcionaría información útil para mejorar o adecuar técnicas de manejo de los cultivos encaminadas a una mayor sostenibilidad de los viñedos. La diversidad existente en los distintos compartimentos suelo-vid podría condicionar la viabilidad de las especies asociadas al pie negro, por lo que el desarrollo de técnicas que permitan manejar el microbioma existente podrían contribuir a eliminar o disminuir la incidencia de estos patógenos.

Por tanto, este estudio ha tenido dos objetivos bien diferenciados: (i) estudiar las variaciones espaciales de las comunidades fúngicas en el suelo, rizosfera y raíces mediante tecnología NGS; y (ii) poner a punto un protocolo de cuantificación absoluta de hongos asociados al pie negro de la vid basado en la tecnología ddPCR, y comparar su eficiencia y sensibilidad con la qPCR.

Materiales y métodos

Toma de muestras

El estudio se realizó en La Rioja, en cinco viñedos jóvenes cultivar 'Tempranillo' injertado sobre el portainjerto 110 Richter, de características edáficas similares. En cada viñedo se seleccionaron al azar cuatro puntos y en cada punto se recogieron tres muestras: suelo, rizosfera (suelo que rodea las raíces) y raíz (endorizosfera). Las plantas no mostraron síntomas externos de enfermedad o deficiencia nutricional. Las raíces no presentaban necrosis en el sistema vascular.

Extracción de ADN

El ADN del suelo y de la rizosfera se extrajo a partir de 0,5 g de muestra con el kit DNeasy PowerSoil. En el caso de las muestras de raíz, se rea-

lizó previamente esterilización con etanol al 70%, y la eliminación de la corteza. El ADN se extrajo a partir de 0,5 g de muestra con el i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit.

Cambios en la dinámica de las comunidades fúngicas. Secuenciación masiva

Para el estudio de las comunidades fúngicas en los distintos compartimentos suelo-planta se utilizó la técnica de secuenciación masiva de amplicones. Para ello, se amplificó la región fúngica ITS2 de las muestras utilizando los cebadores universales ITS3/KYO2 y ITS4 (Toju y col., 2012). La genoteca se preparó de acuerdo con el protocolo de secuenciación metagenómica de Illumina, y las muestras se secuenciaron con el sistema MiSeq utilizando una química de lecturas pareadas de 2 x 300 nucleótidos.

Las estimaciones de diversidad α se calcularon mediante el análisis de los índices de Chao1, que estima el número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra, y de Shannon, que contempla la riqueza y abundancia de las especies. La relación en la composición de OTUs (unidades taxonómicas operativas) entre muestras se estableció mediante el cálculo de métricas de Bray Curtis y se visualizó mediante un gráfico de componentes principales (PCoA). El análisis discriminante lineal (LEfSe) se utilizó para identificar los taxones (nivel de género o superior) que diferían en la abundancia relativa entre los compartimentos suelo-planta.

Cuantificación de patógenos fúngicos asociados al pie negro

El ensayo de ddPCR se realizó en un sistema Bio-Rad QX200 utilizando una sonda TaqMan y los cebadores YT2F y Cyl-R (Dubrovsky y Fabritius, 2007; Tewoldemedhin y col., 2011), los cuales amplifican las principales especies fúngicas asociadas con la enfermedad del pie negro. La generación y lecturas de las microgotas se realizó con el sistema QX200TM (Bio-Rad). El ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en un sistema Bio-Rad CFX384 utilizando los mismos cebadores y la sonda TaqMan descritos anteriormente. Ambos

Premios SEF

| vid |

análisis, ddPCR y qPCR, se llevaron a cabo en BIODONOSTIA-Instituto de Investigación Sanitaria (San Sebastián).

Se construyeron curvas estándar para ambas técnicas a partir de diluciones seriadas de 10.000 a 1 fg μl^{-1} con ADN del aislado BV-0596 de *Illyonectria liriodendri*, perteneciente a la colección del ICVV, con la finalidad de determinar el límite de detección o concentración mínima de ADN que puede detectar cada una de las técnicas. La concentración de ADN de hongos asociados al pie negro se determinó mediante las dos técnicas en las 60 muestras obtenidas de los cinco viñedos. A partir de estos datos se determinó la correlación entre las dos técnicas, y la existencia de diferencias significativas entre compartimentos mediante el programa R versión 3.5 (R Core Team 2017).

Resultados y Discusión

Cambios en la dinámica de las comunidades fúngicas

La evaluación de los cambios espaciales del microbioma mostró que tanto la diversidad como la riqueza de las comunidades de hongos (diversidad α) no difirió significativamente entre viñedos (Figura 1). El 41,4% de las OTUs fueron comunes a los cinco viñedos (Figura 2), y los filos Ascomycota y Basidiomycota representaron el 70% del total de hongos detectados. Estudios previos muestran estos filos como los más relevantes de los presentes en el suelo de viñedos. Ello demuestra la gran presión selectiva que estos microorganismos desarrollan en las comunidades fúngicas del suelo y su capacidad de evolución en condiciones ambientales diferentes. Por otra parte, teniendo en cuenta que los estudios se realizaron en viñedos con condiciones climáticas similares y variables edáficas homogéneas, estos resultados también sugieren que el microbioma del viñedo de La Rioja se conserva parcialmente en la región.

La interfaz suelo-planta constituyó la principal fuente de heterogeneidad de comunidades fúngicas (Figura 3), y la estructura de las comunidades fue distinta entre compartimentos; la riqueza y la diversidad de OTUs en la endorizosfera disminuyó aproxima-

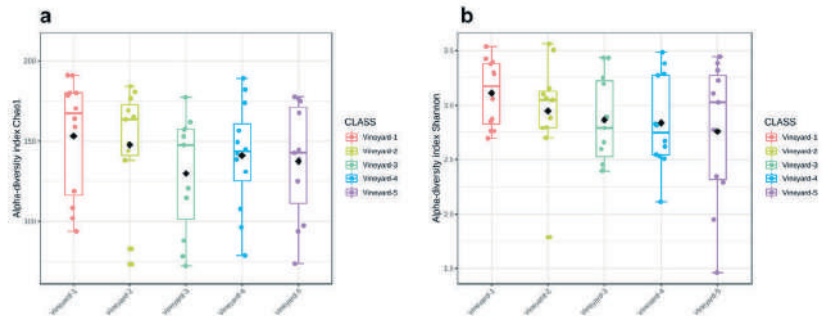


Figura 1. Diversidad α de las comunidades fúngicas entre viñedos, según el estimador de riqueza de Chao1 (a) y el de diversidad de Shannon (b).

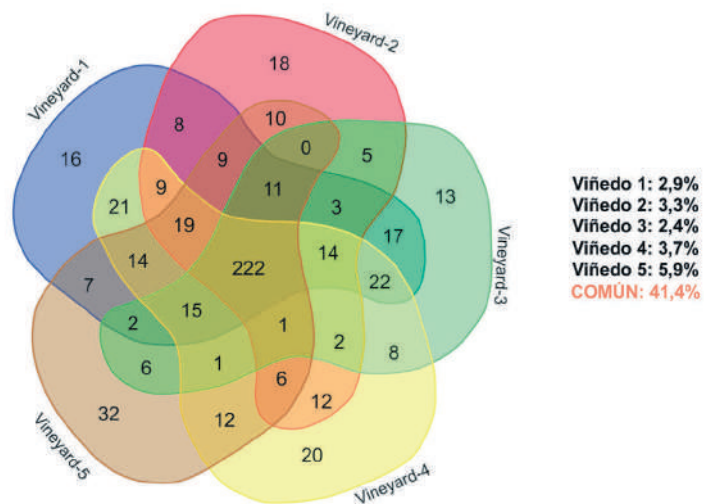


Figura 2. Diagrama de Venn mostrando las OTUs comunes y exclusivas entre viñedos.

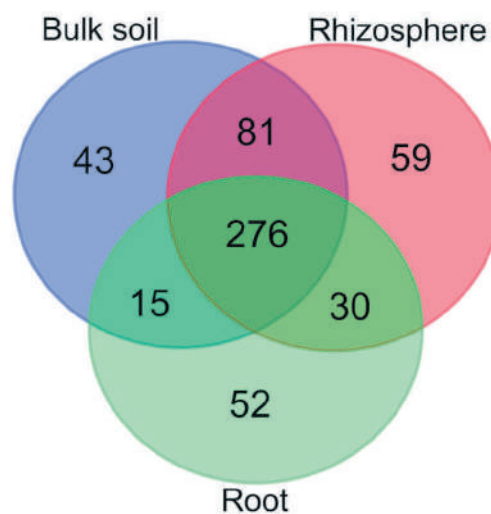


Figura 3. Diagrama de Venn mostrando las OTUs comunes y exclusivas entre compartimentos suelo-planta.

damente a la mitad en relación a la rizosfera (Figura 4), y la comunidad de hongos en esta fue distinta a la de los otros compartimentos (Figura 5). En el suelo y rizosfera predominaron los filo Ascomycota, seguido de Basidiomycota y Zygomycota; sin embargo, en su transferencia hacia la raíz se perdió riqueza en Zygomycota y aumentó en Ascomycota y Basidiomycota (Figura 6).

Se detectaron 25 clados de hongos que permitieron discriminar las comunidades microbianas entre los compartimentos suelo-planta (Figura 7). Ningún filo contribuyó a diferenciar las comunidades de hongos entre suelo y rizosfera, si bien los géneros *Ramicandelaber*, *Clonostachys* e *Ilyonectria* contribuyeron a su diferenciación. Hongos de los filos Zygomycota, Basidiomycota y Chtridiomycota contribuyeron a la diferenciación de las comunidades suelo y endorizosfera, siendo los géneros *Filobasidium*, *Pleospora* y *Psathyrella* los más implicados en esta diferenciación. Los filos Zygomycota y Chytridiomycota, así como hongos no identificados del filo Ascomycota, contribuyeron a la diferenciación de la interfaz rizosfera y endorizosfera, siendo los géneros *Psathyrella*, *Malassezia* y *Filobasidium* los más implicados en esta diferenciación.

Estos resultados indican que existe una selección del microbioma del suelo por parte de la planta, y en la endorizosfera se encuentra finalmente un microbioma más especializado y taxonómicamente distinto, que ha sido capaz de adaptarse y desarrollar mecanismos que le permitan la colonización de la raíz. Esta selección puede estar relacionada con la necesidad de determinados nutrientes por los microorganismos, que pueden ser proporcionados por la raíz a través de exudados que contienen aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos (Bais y col., 2003). La selección también puede ser consecuencia de una competencia nutricional existente entre la planta y los microorganismos en la utilización de determinadas sustancias minerales y otros compuestos presentes en el medio (Bais y col., 2006). Otro de los factores determinantes en la selección de las raíces por el microbioma

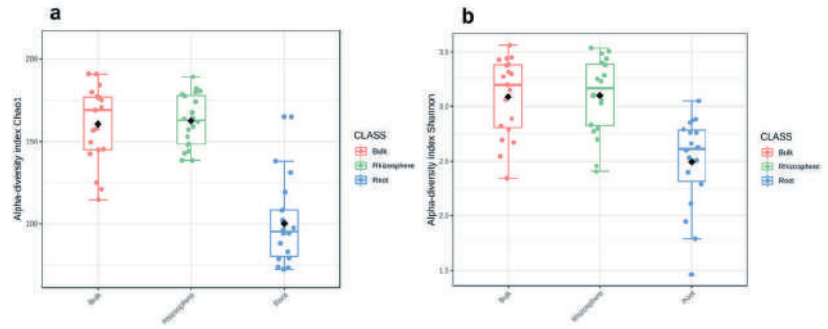


Figura 4. Diversidad α de las comunidades fúngicas entre fracciones suelo-planta, según el estimador de riqueza de Chao1 (a) y el de diversidad de Shannon (b).

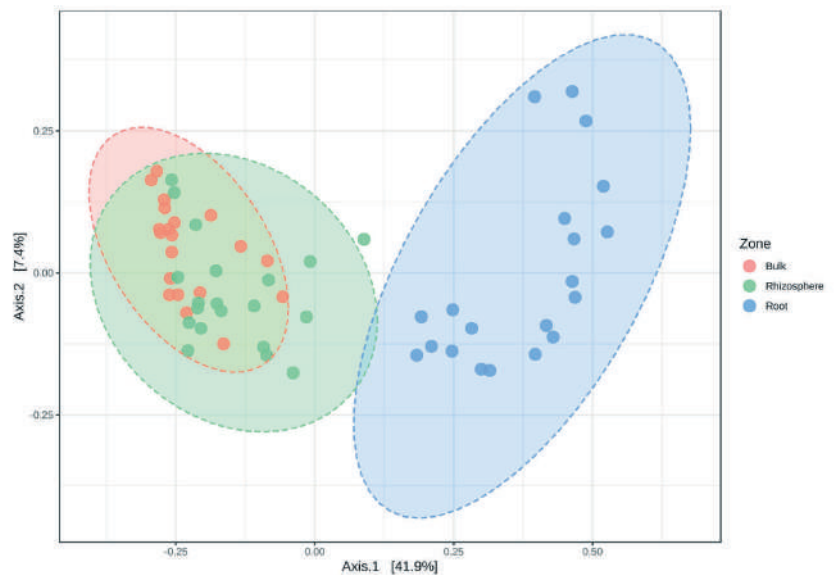


Figura 5. Análisis de componentes principales de Bray Curtis para los compartimentos suelo-planta.

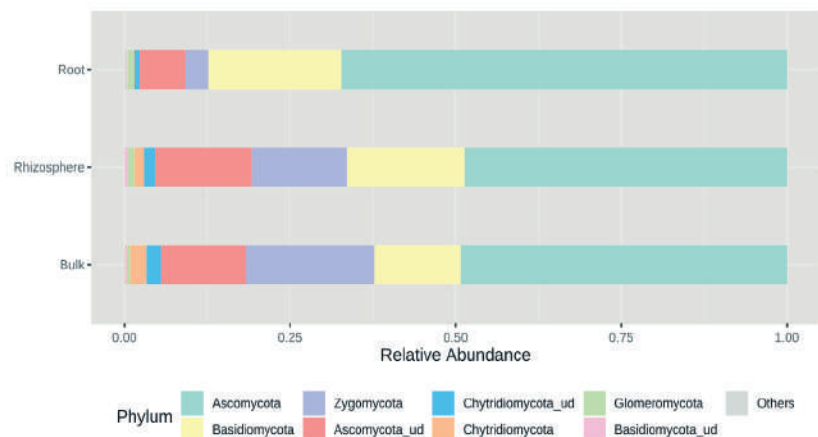


Figura 6. Abundancia relativa de los filos fúngicos en los compartimentos suelo-planta.

viene impuesto por el genotipo. Recientemente se ha demostrado que diferentes portainjertos son capaces de seleccionar de manera diferencial comunidades bacterianas y fúngicas del suelo circundante (Berlanas y col., 2019a). Todo ello conlleva cambios en la actividad biológica y la estructura del suelo que condiciona la supervivencia o no de determinados microorganismos. Además, el tejido asintomático de la endorizosfera puede ser colonizado por hongos asociados al pie negro de la vid (Berlanas y col., 2019b), como por ejemplo diversas especies de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria*, que bajo condiciones específicas adquieren carácter patagénico. En nuestro estudio, la familia Nectriaceae, en la que se incluyen los principales hongos causantes de la enfermedad del pie negro, ha sido detectada en los compartimentos de rizosfera (10,1%) y endorizosfera (30,7%), y concretamente el género *Ilyonectria* representó un papel importante en la discriminación entre ambas, lo que corrobora el papel selectivo de la raíz y la presencia endófito de estos patógenos en las raíces de vides asintomáticas.

Cuantificación de patógenos fúngicos asociados a pie negro

La ddPCR es una tecnología de última generación que está siendo utilizada en distintos campos científicos, incluida la patología vegetal, para la cuantificación de ADN, mostrándose como una técnica más sensible que la qPCR, permitiendo una cuantificación absoluta del ADN de organismos en muestras ambientales.

En este trabajo se ha demostrado la validez de esta técnica como una herramienta para detectar y cuantificar hongos patógenos asociados a la enfermedad del pie negro en muestras de suelo y planta. A pesar de que se utilizó exclusivamente el genoma de *Ilyonectria liriodendri* BV-0596 para el cálculo del número de copias de cada muestra, lo que puede introducir un sesgo en las especies de hongos asociados a la enfermedad del pie negro, tanto la ddPCR como la qPCR mostraron ser técnicas eficientes para detectar y cuantificar ADN de formas asexuales similares

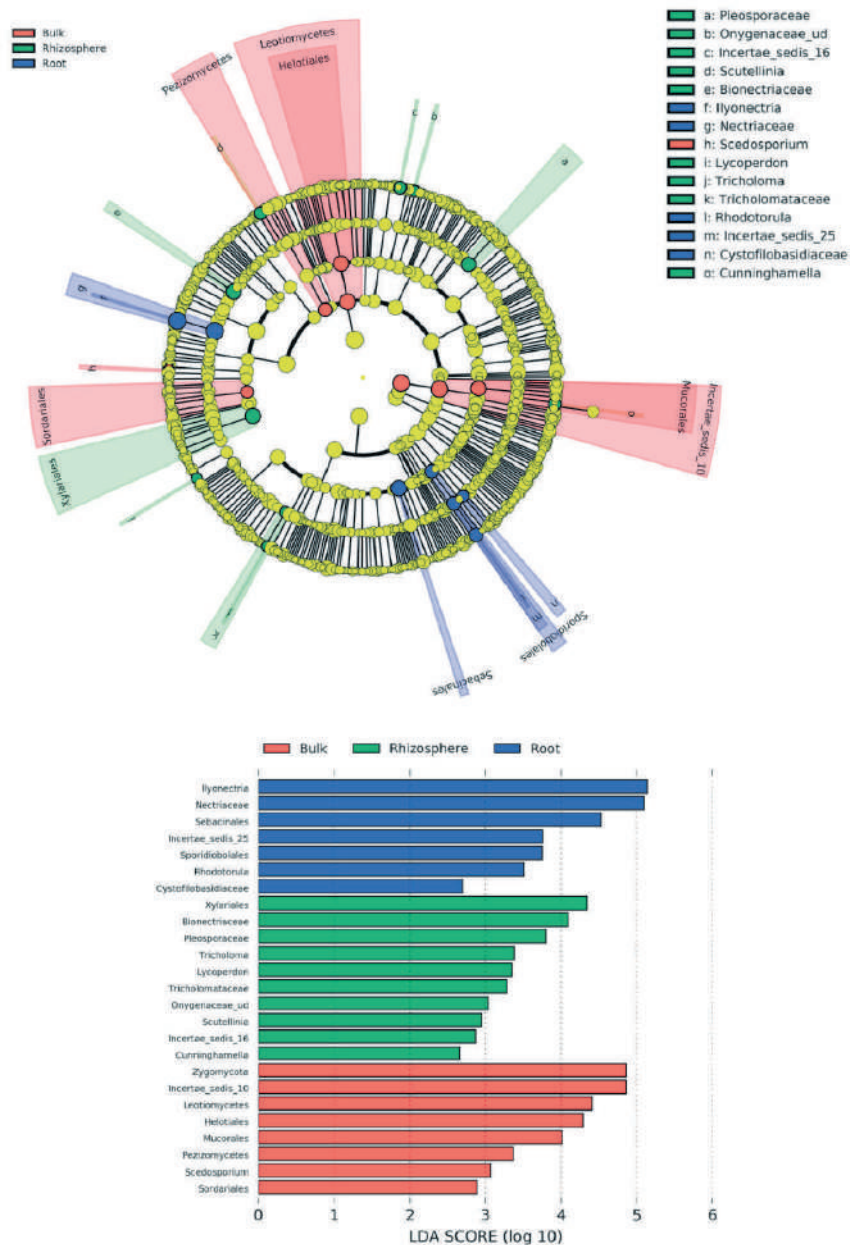


Figura 7. Análisis discriminante lineal (LDA). (a) Cladograma mostrando los valores LDA. (b) Gráfico de barras con los taxones discriminantes para cada compartimento suelo-planta con valor >2 LDA.

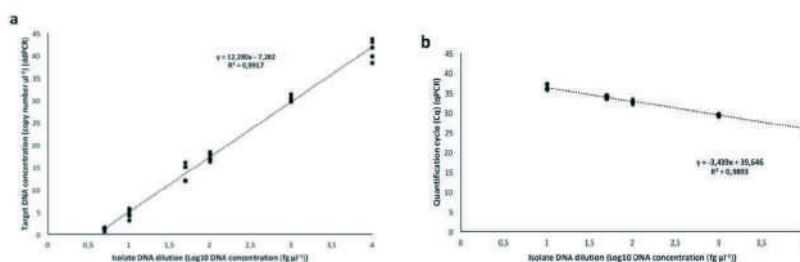


Figura 8. Curvas estándar obtenidas a partir de diluciones de ADN del aislado BV-0596 de *Ilyonectria liriodendri* que varían de 10.000 a 1 fg μl^{-1} . El logaritmo de la concentración de cada dilución se representó frente a: a) la concentración de ADN objetivo (número de copias μl^{-1}), para la técnica de la ddPCR; b) el ciclo de cuantificación (Cq), para la técnica de la qPCR. Los puntos de datos representan resultados de amplificación de cinco repeticiones.

a “*Cylindrocarpon*-like” asociadas a la enfermedad del pie negro (Figura 8). Ambos métodos mostraron una buena linealidad dentro del rango de cuantificación con un alto coeficiente de correlación de las curvas estándar ($R^2=0,9917$ y $0,9893$), y eficiencias de $0,83$ y $0,97$ para ddPCR y qPCR, respectivamente. La ddPCR resultó ser una técnica más sensible presentando un límite de detección de $5 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ frente a $10 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ detectados mediante qPCR. Además, los resultados de la cuantificación con ambas técnicas mostraron una correlación significativa ($R^2=0,95$) (Figura 9).

Este es el primer estudio de cuantificación absoluta de hongos asociados al pie negro, y constituye el punto de partida para la utilización de la ddPCR en la cuantificación de otros grupos de hongos asociados a EMV. Estas nuevas metodologías podrán resultar muy útiles en diferentes aspectos relacionados con estas enfermedades, incluyendo la adecuada toma de decisiones para su manejo.

La ausencia de diferencias significativas en las concentraciones de hongos asociados al pie negro entre suelo, rizosfera y endorizosfera, obtenidas tanto por ddPCR como por qPCR, indican que los compartimentos suelo-planta no afectan a la abundancia de estos hongos en vides asintomáticas (Figura 10). Esto puede ser explicable por la existencia de una alta presión de estos hongos en el suelo. Estos hongos que pueden proceder de la incorporación a los suelos de restos de vides infectadas o de vegetales de los que son huéspedes habituales, como cereales o brasicáceas que suelen ser utilizados en la rotación del cultivo en viveros (Agustí-Brisach y col., 2011; Langenhoven y col., 2018), tienen la capacidad de formar clamidosporas, formas de resistencia que perviven en el suelo durante años en ausencia de huésped (Petit y col., 2011). Por otra parte, la presencia de estos hongos como endófitos también podrían explicar las elevadas concentraciones encontradas en plantas asintomáticas, desencadenando la enfermedad bajo condiciones de

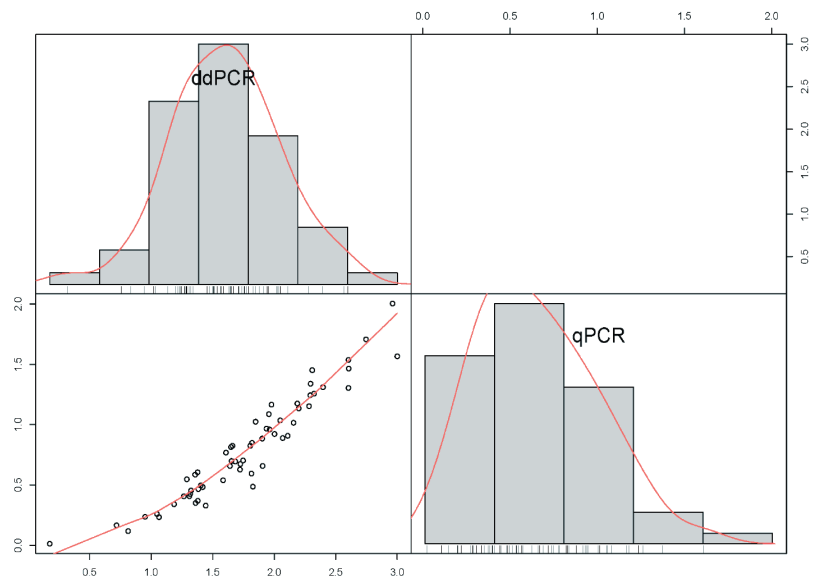


Figura 9. Correlación entre ambas técnicas, ddPCR y qPCR, en la cuantificación de hongos patógenos asociados a la enfermedad del pie negro de la vid, en muestras de suelo y planta. La distribución de la concentración de ADN de especies fúngicas asociadas al pie negro se muestra en la parte superior izquierda (ddPCR) e inferior derecha (qPCR) y el diagrama de dispersión bivariable en la parte inferior izquierda.

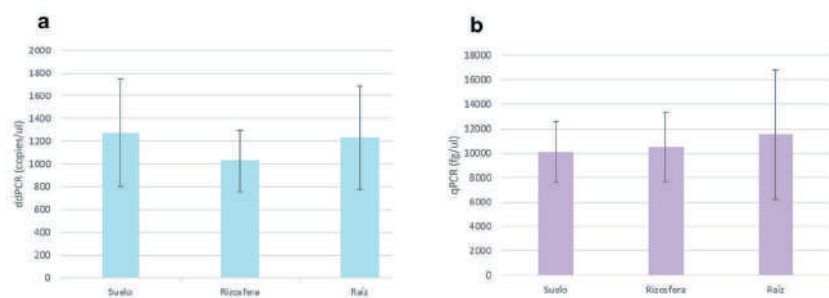


Figura 10. Concentración de ADN de especies fúngicas asociadas al pie negro de la vid, en los tres compartimentos suelo-planta (suelo, rizosfera y raíz) de los cinco viñedos estudiados, mediante (a) ddPCR y (b) qPCR. Las barras representan el error estándar de la media ($n = 20$).

estrés biótico y/o abiótico (Gramaje y col., 2018).

Conclusiones

Los estudios del análisis de los compartimentos suelo-planta en cinco viñedos de La Rioja indican que la diversidad y composición de las comunidades fúngicas varía entre los distintos compartimentos, mientras que es estable entre viñedos. La endorizosfera ha sido el compartimento que más se ha diferenciado, sugiriendo que los tejidos radiculares suponen una barrera para la colonización y selección de hongos.

Con respecto a la abundancia de hongos asociados a la enfermedad

del pie negro, se observó una correlación significativa en los resultados obtenidos con ambas técnicas (ddPCR y qPCR), si bien la ddPCR resultó ser la más sensible. Ambas técnicas mostraron que la abundancia de hongos asociados al pie negro no varía significativamente entre los distintos compartimentos suelo-planta.

Los estudios futuros deben de ir encaminados a investigar (i) los mecanismos de colonización y establecimiento en la raíz por parte de los hongos asociados a la enfermedad del pie negro, y (ii) qué desencadena que estos hongos pasen de ser endófitos a patógenos, desarrollando la enfermedad.

Bibliografía



- Agustí-Brisach, C. y Armengol, J. 2013. Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathol. Mediterr.* 52:245–261.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., León, M., García-Jiménez, J. y Armengol, J. 2011. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. *Plant Dis.* 95:803–810.
- Bais, H.P., Vepachedu R., Gilroy, S., Callaway, M. y Vivanco, J.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301:1377–80.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. y Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233–66.
- Berlanas, C., Berbegal, M., Elena, G., Laidani, M., Cibrián, J.F., Sagües-Sarasa, A. y Gramaje, D. 2019a. The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated With Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Front. Microbiol.* 10:1142.
- Berlanas, C., Ojeda, S., López-Manzanares, B., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Martínez-Diz, M.P., Díaz-Losada, E. y Gramaje, D. 2019b. Occurrence and diversity of black-foot disease fungi in symptomless grapevine nursery stock in Spain. *Plant Dis.* (aceptado)
- Dubrovsky, S. y Fabritius, A. L. 2007. Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathol. Mediterr.* 46:84–86.
- Gramaje, D. y Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Dis.* 95:1040–1055.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R. y Sosnowski, M.R. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102:12-39.
- Hallen, F., Fourie, P.H. y Crous, P.W. 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 45:S55–S67.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I. y col. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantification of DNA copy number. *Analytical Chemistry* 83:8604–8610.
- Langenhoven, S. D., Halleen, F., Spies, C. F. J., Stempien, E. y Mostert, L. 2018. Detection and quantification of black foot and crown and root rot pathogens in grapevine nursery soils in the Western Cape of South Africa. *Phytopathol. Mediterr.* 57:519–537.
- Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, E., Wilcox, W.F. y Rolshausen, P.E. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *Am J Enol Viticult* 62:177–183.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Mostert, L. y McLeod, A. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 129:637–651.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S. y Sato, H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One* 7:e40863.