



“Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León”

THAIS MARTINS MARQUES COSTA

TESIS DOCTORAL

2013

Universidad de Salamanca

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

ÁREA DE GENÉTICA

Caracterización fisiológica y genética de las
poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los
viñedos de Castilla y León

Memoria que presenta Thais Martins Marques Costa para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, a de Junio de 2013

**D. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DEL
ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

AUTORIZA

la presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León”, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, que ha sido realizada por Doña Thais Martins Marques Costa, bajo mi dirección, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a de Junio de 2013

Fdo. Dr. D. Ernesto Pérez Benito

**D. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DEL
ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICA

que Doña Thais Martins Marques Costa ha realizado en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética el trabajo titulado: “Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León”, bajo mi dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Salamanca, a de Junio de 2013

Fdo. Dr. D. Ernesto Pérez Benito

D. LUIS FERNÁNDEZ LAGO, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA

que la memoria titulada: “Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León”, presentada por Doña Thais Martins Marques Costa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del doctor D. Ernesto Pérez Benito, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Salamanca, a de Junio de 2013

Fdo. Dr. D. Luis Fernández Lago

Agradecimientos

Agradezco antes de todo a Dios, que por algún motivo ha mirado por mí desde que he venido al mundo.

A mi madre que me crió como madre y padre a la vez y ha sacrificado su vida para darnos algo mejor. En memoria a mi padre y mis abuelas María y Aurea, que estarían muy contentos de poder ver donde he llegado. A mi hermano Can, por su apoyo desde la distancia. A mi familia.

A Ernesto Pérez Benito por haberme elegido para realizar este trabajo, por creer en mí cuando yo mismo no creía, por enseñarme a buscar la perfección en todo lo que hago. A Serenella por enseñarme como trabajar duro, y también por las conversaciones sobre la vida y sobre las plantas. A Mike por las conversaciones en inglés. A José María Minguez por haber creído en mí y haberme aceptado para entrar en el grupo de investigación del CIALE como practicante. Sois un ejemplo para mí.

A mis compañeros de laboratorio Juan Luis, David, Raúl, Choni, Caty, Vega, José, Walter, José II, Jonatan, Virginia, Dani, Vinicio, Eduardo por haber colaborado en mi aprendizaje en ciencias. A Gabriel Rech por su ayuda en los análisis y la corrección de mi tesis. A Esther Menéndez y a Vega Tello por la corrección del "portuñol". Al técnico Elena.

A los compañeros pasajeros de laboratorio: Magda y Joanna, Justyna y Adam, Kamila y Tomaz, Magda y Monika, Basia y Zuzanna que me han ayudado a mejorar mi inglés y me han enseñado particularidades de la cultura polaca.

A la familia Gimeno, que me enseñan cada día algo nuevo, por poder compartir sus emociones vividas, sus alegrías, por abrir las puertas de su casa a una chica extranjera, sin ningún recelo y hacerme sentir parte de la familia.

A Carlos Gimeno, por su apoyo incondicional.

Los trabajos experimentales relacionados con la obtención de los perfiles de marcadores moleculares se han desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de ITACyL. Agradezco las facilidades ofrecidas por el propio ITACyL para la realización de estos análisis y a la Doctora Doña Marta Hernández Pérez y a Doña Raquel Campo Guijarro su excelente disposición y su amabilidad.

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Genética del Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), en el marco del Proyecto de investigación ITACyL SA-02-C2-1, financiado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, que permitió además mi contratación como becaria adscrita a un proyecto, y del proyecto AGL2012-39876-C02, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice	III
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	XI
Símbolos y Abreviaturas.....	XIII
Resumen	XVII
Introducción	3
1 - <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.1 - Aspectos generales	4
1.2 – Sistemática y descripción.....	5
1.3 – Ciclo de vida.....	6
1.4 – Ciclo de infección y epidemiología	8
1.5 – Diversidad genética	11
1.5.1 – Número de núcleos y cromosomas.....	11
1.5.2 – El ciclo sexual en la naturaleza y en el laboratorio.....	12
1.5.3 – Elementos extracromosomales.....	14
1.5.4 – Compatibilidad somática y heterocariosis.....	19
1.6 – Métodos de control de la enfermedad	20
1.6.1 - Control químico	21
1.6.2 - Control biológico	22
1.6.3 - Prácticas culturales y manejo del hábitat local.....	24
1.6.4 – Estimulación de las defensas de la planta.....	25
1.6.5 – Mejora genética.....	26
2 - La vid	28
2.1 – Origen y sistemática	28
2.2 – El cultivo de la vid.....	30
2.2.1 - La vid en el mundo	30
2.2.2 - La vid en España	31
2.2.3 - La vid en Castilla y León.....	33
2.3 – <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de la Vid	35
2.3.1 – Sintomatología en vid y efectos sobre el cultivo	35
2.3.2 – Factores que afectan a la enfermedad.....	39

3 - Marcadores moleculares	45
3.1 - Consideraciones generales	45
3.2 - Tipos de marcadores moleculares	47
3.2.1 - RFLP	48
3.2.2 - RAPD	49
3.2.3 - AFLP	49
3.2.4 - Microsatélites	50
3.2.5 - SCAR	51
3.2.6 - SNP	52
4 – Variación molecular y genética de poblaciones	52
4.1 - Análisis en genética de poblaciones	54
4.1.1 - Análisis de la variación genética dentro de las poblaciones	56
4.1.2 - Análisis de la variación genética entre poblaciones	58
4.2 – Estudios poblacionales en <i>B. cinerea</i> usando marcadores moleculares	59
Objetivos	67
Materiales y Métodos	71
1 – Organismos	71
1.1 – Hongos	71
1.2 – Plantas	72
2 – Medios y condiciones de cultivo	73
2.1 - Hongos	73
2.1.1 - Cultivo en medio líquido de <i>B. cinerea</i>	73
2.1.2 - Cultivo en medio sólido de <i>B. cinerea</i>	73
2.2 - Plantas	74
3 – Manejo de <i>B. cinerea</i>	75
3.1 – Extracción de esporas de <i>B. cinerea</i>	75
3.2 – Conservación de aislados	75
3.3 - Obtención de cultivos monospóricos	75
3.4 - Recuento de esporas	76
4 – Purificación de aislados de campo	76
5 - Caracterización fisiológica	77
5.1 – Ensayos de crecimiento saprofito	77
5.2 – Ensayos de infección en plantas	78
5.2.1 - Preparación de los discos	78

5.2.2 - Preparación del material vegetal e inoculación.....	78
5.2.3 - Lectura del ensayo	79
5.2.4 - Tratamiento estadístico de los datos	79
6 – Extracción de ácidos nucleicos.....	80
6.1 - ADN genómico de <i>B. cinerea</i>	80
7 – Amplificación de ADN por PCR	80
8 – Electroforesis de ácidos nucleicos	82
9 – Obtención de AFLPs	83
9.1 - Digestión con enzimas de restricción y ligación de adaptadores a los fragmentos de restricción.....	83
9.2 - Amplificación pre-selectiva	84
9.3 - Amplificación selectiva	86
9.4 - Separación de los fragmentos en gel desnaturizante de poliacrilamida	87
10 – Análisis de datos.....	88
10.1 - Análisis de geles	88
10.2 - GeneMapper y construcción de matrices.....	88
10.3 - Evaluación de la diversidad genética	92
10.3.1 - Estimación de las relaciones genéticas entre individuos	92
10.3.2 - Parámetros de diversidad genética de las poblaciones	94
10.3.3 – Estructura genética de las poblaciones.....	95
10.4 - Análisis del modo de reproducción	97
Resultados	101
1 - Incidencia de <i>B. cinerea</i> en los viñedos de Castilla y León	101
1.1 - Selección de viñedos (D.O.) y variedades de vid en 2007	102
1.2 – Aislados recogidos en campañas previas: 1999-2002.....	123
1.3 – La población de trabajo en este estudio	125
2 - Caracterización fisiológica.....	129
2.1 - Crecimiento saprofito.....	129
2.2 - Agresividad sobre judía.....	134
2.3 – Correlación entre crecimiento saprofito y agresividad sobre judía.....	140
2.4 - Agresividad sobre variedades de vid y sobre tomate.....	142
2.5 - Análisis estadístico: correlaciones.....	157
3 - Genética de poblaciones y diversidad genética.....	160
3.1 – AFLP.....	160

3.1.1 – Optimización de las condiciones experimentales	161
3.2 - Análisis de diversidad genética.....	171
3.2.1 – Descripción de la extracción de datos	171
3.2.2 – Análisis de diversidad genética.....	171
3.2.2.1 - Relaciones genéticas entre individuos.....	172
3.2.2.2 - Parámetros de diversidad genética de las poblaciones: D.O.	182
3.2.2.3 - Estructura genética de las poblaciones	184
3.2.2.4 - Efecto del criterio "variedad de vid" y "año de recogida"	191
3.2.2.5 - Análisis de la diferenciación de la población "minoritaria"	198
3.3 - Análisis del modo de reproducción de <i>B. cinerea</i> en los viñedos de Castilla-León.....	199
3.4 - Transposones	203
Discusión	209
<i>Botrytis cinerea</i> en los viñedos de Castilla y León.....	209
Diversidad fisiológica de <i>B. cinerea</i>	213
Diversidad genética	220
Conclusiones	233
Apéndice I.....	239
Apéndice II.....	240
Apéndice III	241
Apéndice IV	242
Bibliografía	245

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>B. cinerea</i> (Tomado de Anselem <i>et al.</i> , 2001).....	6
Figura 2. <i>B. cinerea</i> en distintas fases de su ciclo de vida. Desde arriba a la izquierda en sentido horario: conidióforo con esporas, apotecios, 2 ascas con 8 ascosporas, micelio infectando a una planta y espora germinando (tomado de Williamson <i>et al.</i> , 2007).	8
Figura 3. Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i>	8
Figura 4. Infección de <i>B. cinerea</i> sobre vid. A - variedad Verdejo (Peñafiel, Burgos); B - variedad Malvasía (Toro, Zamora).....	37
Figura 5. Infección de <i>B. cinerea</i> sobre racimos de vid. A - Infección sobre la variedad Malvasía en la denominación de origen Toro (Zamora). B - Infección sobre la variedad Tinta del País en la denominación de origen Ribera del Duero (Burgos).....	42
Figura 6. Purificación de <i>B. cinerea</i> (tomado de Tello, 2006).....	77
Figura 7. Mapa de la Comunidad Autónoma de Castilla y León que presenta la ubicación y la extensión de las principales zonas productoras de vino indicando aquellas que han sido seleccionadas para realizar el presente trabajo.....	103
Figura 8. Foto realizada con la herramienta Google Earth, donde se presentan las localidades de los viñedos.....	104
Figura 9. Aspecto de un racimo de vid (variedad Tempranillo) infectado por <i>B. cinerea</i> . Fotografía tomada en el viñedo a pie de planta.....	105
Figura 10. (A) Racimo de vid sin presencia aparente de <i>B. cinerea</i> . (B) Bayas procedentes de un racimo asintomático colocadas sobre una placa de PDA. (C) Microorganismos desarrollándose sobre una placa de PDA a partir de bayas de un racimo asintomático. (D) Vista global del desarrollo de microorganismos de las bayas seleccionadas sobre placas de medio de cultivo sintético.	106
Figura 11. Gel de electroforesis con los productos de amplificación generados en las reacciones de PCR llevadas a cabo con ADN molde obtenido de los aislados de campo de <i>B. cinerea</i> 202 (1), 206 (2), 207 (3), 209 (4), 211 (5), 212 (6), 216 (7), 217 (8), 222 (9) y (C) de la cepa de colección de <i>B. aclada</i> , utilizando los oligonucleótidos SCAR1 IDB-1 y SCAR2 IDB-2. M – Marcador de tamaño de 1 kb ladder (Biotools).	108
Figura 12. Imagen de una placa de Petri con medio PDA en la que se desarrollan tres cepas de <i>B. cinerea</i> fenotípicamente diferentes obtenidas a partir de bayas procedentes del mismo racimo.....	121
Figura 13. Aislados de <i>B. cinerea</i> de cultivo monospóricos obtenidos de una misma cepa madre.	121
Figura 14. Crecimiento radial (diámetro medio de la colonia en cm a las 72h) en placas de medio MEA de los aislados de campo analizados. Se indica en cada caso el error estándar.	130
Figura 15. Clases fenotípicas establecidas en función de la capacidad de crecimiento saprofítico y número de individuos pertenecientes a cada clase.....	132
Figura 16. Agresividad de los distintos aislados de <i>B. cinerea</i> sobre judía estimada como el diámetro medio de lesión dispersiva (cm) a las 63 horas desde la inoculación.	135

Figura 17. Distribución de los individuos en clases fenotípicas del carácter "agresividad sobre judía" establecidas en función del diámetro medio de lesión sobre hojas de judía. El histograma representa los datos recogidos en la Tabla 12.	137
Figura 18. Diagrama de correlación entre el diámetro medio (cm) sobre placas de medio MEA y el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre judía en la población de aislados de campo de <i>B. cinerea</i> analizados.	141
Figura 19. Imagen que muestra ejemplos de las lesiones producidas por cuatro cepas diferentes de <i>B. cinerea</i> (de arriba y de izquierda a la derecha: 251, 230, 207 y 276) inoculadas sobre hojas de la variedad de vid Tempranillo en el momento de tomar las mediciones.	143
Figura 20. Agresividad sobre las variedades tintas de vid Tempranillo, Garnacha, Prieto Picudo y Tinta de Toro, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 93 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de <i>B. cinerea</i>	144
Figura 21. Agresividad sobre variedades blancas de vid Verdejo, Albillo Real y Albillo Mayor, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 93 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de <i>B. cinerea</i>	145
Figura 22. Agresividad sobre tomate y sobre judía, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 63 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de <i>B. cinerea</i> . En la parte inferior de la figura se presenta el histograma correspondiente que muestra la capacidad de crecimiento saprofítico de los aislados analizados (el segundo y tercer histogramas se han preparado con los datos extraídos de los histogramas que se presentan en las figuras 15 y 13, respectivamente).	146
Figura 23. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases XIV, XIII, XI y X. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).	150
Figura 24A. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases IX, VIII y VII. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).	151
Figura 25A. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases V, IV, III y II. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).	153
Figura 26. Esquema simplificado de las fases que se siguen en la detección de marcadores moleculares de tipo AFLP.	162
Figura 27. Ejemplo de electroferograma de pobre calidad general, presentado en la parte superior de la figura, en comparación con un electroferograma de calidad y susceptible de ser analizado, presentado en la parte inferior.	165
Figura 28. Ejemplos de pico doble (un defecto) que no deben ser considerados en la matriz final.	166
Figura 29. Ejemplo de reproducibilidad de la metodología utilizada para generar AFLPs. Se presentan dos perfiles electroforéticos resultantes del análisis de AFLPs obtenidos con el aislado 177a a partir de dos extracciones de ADN distintas.	167

Figura 30. Reproducibilidad del análisis de ADN con AFLPs en la comparación llevada a cabo con dos muestras de ADN del mismo aislado (A y B - UCA001) y la muestra de ADN de un aislado diferente (C - Bd90).	168
Figura 31. Dendograma UPGMA construido a partir de los coeficientes de similitud entre 26 aislados de <i>B. cinerea</i> y sus correspondientes réplicas obtenidos con la matriz binaria derivada de los electroferogramas generados con los cebadores <i>EcoRI-AC/MseI-CA</i>	170
Figura 32. Fórmula para el cálculo del coeficiente de similitud de DICE.	173
Figura 33. Dendograma generado mediante el método de agrupamiento UPGMA utilizando una matriz (con clones) de coeficiente de similitud tipo DICE entre aislados de <i>B. cinerea</i> . Los aislados fueron obtenidos en las DO: 1-Arribes de Duero, 2-Bierzo, 3-Cádiz, 4-Cigales, 5-Ribera del Duero, 6-Rueda, 7-Sierra de Salamanca y 8-Toro, a partir de las variedades de vid: A-Albillo, B-Bruñal, C-Cabernet Sauvignon, D-Gajo Arroba, E-Garnacha, F-Jerez Palomino, G-Juan García, H-Maldón, I-Malvasía, J-Malbec, L-Moscatel, M-Merlot, N-Pipajo, O-Rufete, P-San Jeromo, Q-Sauvignon Blanc, R-Tempranillo, S-Tempranillo Blanco, T-Tinta de Toro, U-Verdejo, V-Viura y X-Teta de Cabra. Se incluyen las cepas de referencia EB05.10, T4, Bd90, UCA001, UCA156 y UCA206. En los elipses de color están identificados los aislados que son considerados clones. (En la parte superior de esta página se presenta el dendograma completo sin códigos y en las páginas siguientes se muestra el dendograma en detalle).	175
Figura 34. Análisis de Coordenadas Principales realizado con los datos de la población original (en el programa NTSyS). En verde fue marcado el grupo mayoritario que se agrupa en este análisis y en color naranja fue marcado el grupo que se separa de la mayoría de los aislados (Ver el texto para más detalles).	181
Figura 35. Dendograma UPGMA (realizado con el programa NTSyS) construido con los valores de "Distancia Genética de Nei" (Coefficient) entre subpoblaciones presentados en la Tabla 18 y generados con el programa PopGene. Los códigos identificativos de las poblaciones de <i>B. cinerea</i> establecidas en función de las D.O. son: R1-Arribes, R2-Cigales, R3-Ribera del Duero, R4-Rueda, R5-Sierra de Salamanca y R6-Toro.	187
Figura 36. Análisis de Coordenadas Principales para las 6 poblaciones (D.O.) con la matriz con clones.	188
Figura 37. Correlación entre la Distancia Geográfica (eje X, expresada como el logaritmo neperiano de la distancia en Km) y la Distancia Genética de Nei (eje Y) entre poblaciones de las zonas productoras de Castilla y León seleccionadas.	189
Figura 38. Dendograma UPGMA de las poblaciones de <i>B. cinerea</i> establecidas según las variedades de vid a partir de las cuales los aislados fueron recogidos y construido sobre los valores de Distancia Genética de Nei entre subpoblaciones. (R1-Garnacha, R2-Juan García, R3-Malvasía, R4-Rufete, R5-Tempranillo, R6-Tinta de Toro, R7-Verdejo y R8-Viura).	195
Figura 39. Gel de electroforesis en el que se separan los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos F300 y F1550 utilizando como ADN molde ADN de los aislados 369 (1), 371(2), 372(3), 375(4), 376(5), 377(6), 378(7), 380(8), 381(9), 394 (11), 397 (12), 399 (13), 400 (14), 403 (15), 407 (16), 409 (17), 412 (18), 413 (19) Las carreras (10) y (20) corresponden a reacciones control llevadas a cabo en ausencia de ADN molde (sustituido por ddH ₂ O). M es un marcador de tamaño de 1 kb ladder (Biotools)..	204
Figura 40. Gel de electroforesis obtenido en el ensayo con los oligonucleótidos que amplifican el elementos transponible <i>Boty</i> . Los ADNs utilizados en este ensayo son los mismos que los presentados en la Figura 39.	204

Figura 41. Distribución de los aislados de campo de *B. cinerea* obtenidos en los viñedos de Castilla y León en las clases establecidas en función de los elementos transponibles que cada aislado posee. 205

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	81
Tabla 2. Oligonucleótidos selectivos utilizados en el análisis de AFLPs.	87
Tabla 3. Denominaciones de Origen y Zonas Vinos de la Tierra de Castilla y León seleccionadas.....	103
Tabla 4. Municipio al que pertenecen los viñedos visitados dentro de cada zona productora.	104
Tabla 5. Colección de aislados de campo de <i>B. cinerea</i> recogidos sobre vid en la campaña de 2007. En amarillo se puede apreciar los aislados seleccionados para el análisis fisiológico y molecular.....	109
Tabla 6. Racimos analizados y racimos con <i>B. cinerea</i> por zona productora (campaña 2007).	122
Tabla 7. Aislados de <i>B. cinerea</i> (colección 2007) divididos por DO y variedad de uva.....	122
Tabla 8. Colección de cepas de <i>B. cinerea</i> recogidos en la campaña 2002 y utilizados en este trabajo.....	124
Tabla 9. Aislados de <i>B. cinerea</i> caracterizados en este estudio.	126
Tabla 10. Clases fenotípicas definidas en función del grado de expresión del carácter "crecimiento saprofito en medio MEA", rango de variación de cada una de ellas, media y error estándar y número de aislados que se incluyen en cada una.	131
Tabla 11. Análisis post-hoc mediante el test de Tukey de las diferencias entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas en relación con el carácter "Crecimiento saprofito en medio MEA" (evaluado mediante la estimación del diámetro medio de la colonia en medio MEA –en cm- de los individuos incluidos en cada clase.	133
Tabla 12. Clases fenotípicas establecidas para el carácter "agresividad sobre Judía" estimado en función del diámetro medio de lesión dispersiva producido en hojas: Descripción de los intervalos que caracterizan cada clase, número de aislados incluidos en cada una de ellas y valores medios característicos en cada caso con los correspondientes valores de error estándar.....	137
Tabla 13. Análisis post-hoc mediante el test de Tukey de las diferencias entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas en relación con el carácter "agresividad en judía" (evaluado mediante la estimación del diámetro medio de lesión -en cm- de los individuos incluidos en cada clase).	139
Tabla 14. Valores del coeficiente de correlación de Pearson ("r") obtenidos cuando se analizan por parejas las agresividades sobre cada uno de los huéspedes analizados (estimada en cada caso como el diámetro medio de lesión dispersiva generada). Se incluye también como variable la capacidad de crecimiento saprofito, estimada como la media del diámetro de la colonia en medio sintético MEA.....	159
Tabla 15. Valores de similitud entre los dos miembros de cada réplica biológica ("a" y "b") para los 26 aislados analizados en el ensayo de reproducibilidad. La tabla presenta para cada aislado el valor del coeficiente de similitud de Dice de cada individuo con su réplica.	169
Tabla 16. Índices de diversidad genética obtenidos analizando la población de aislados subdividida en función del factor D.O. donde se realizó la recogida de aislados. Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).	183

Tabla 17. Cálculo del coeficiente de Diferenciación (G_{st}) y del número de migrantes (Nm) en la población original con clones y en la población corregida sin clones. (H_s : heterocigosidad promedio esperada; H_t : diversidad genética promedio sobre todos los <i>loci</i> en la población global).....	185
Tabla 18. Valores de "Distancia Genética de Nei" entre subpoblaciones en las combinaciones indicadas, generados a partir de la matriz sin clones.	186
Tabla 19. Distancia lineal (Km) entre las localidades representativas seleccionadas como centro geográfico de cada Denominación de Origen o zona de Vinos de la Tierra.	188
Tabla 20. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de <i>B. cinerea</i> teniendo en cuenta el factor de agrupamiento D.O. (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).	191
Tabla 21. Relación del número de aislados agrupados por Variedad de Uva.....	192
Tabla 22. Relación del número de aislados agrupados por año de aislamiento.	192
Tabla 23. Índices de diversidad genética analizando la población de aislados subdividida en función del criterio "Variedad de vid de origen". Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).	193
Tabla 24. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de <i>B. cinerea</i> teniendo en cuenta el factor de agrupamiento "Variedad de vid de origen" (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).	196
Tabla 25. Índices de diversidad genética analizando la población de aislados subdividida en función del año de recolecta. Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).	196
Tabla 26. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de <i>B. cinerea</i> teniendo en cuenta el factor de "Año de recogida". (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).	197
Tabla 27. Cálculo del coeficiente de Diferenciación (G_{st}) y del número de migrantes (Nm) en la población original con clones y en la población corregida sin clones considerando la población subdividida en la población mayoritaria y en la población minoritaria detectadas en nuestro análisis (H_s : heterocigosidad promedio esperada; H_t : diversidad genética promedio sobre todos los <i>loci</i> en la población global).	198
Tabla 28. Análisis de la varianza molecular considerando la población de aislados de <i>B. cinerea</i> subdividida en la población mayoritaria y en la población minoritaria detectadas en nuestro análisis (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).	199
Tabla 29. Estimación del índice de asociación I_A y del índice rd como medidas de desequilibrio de ligamiento en las poblaciones de <i>B. cinerea</i>	201
Tabla 30. Prueba de dos <i>loci</i> de LD en las poblaciones analizadas. Para cada población se ha calculado el número de combinaciones de pares de <i>loci</i> en las que se obtienen evidencias de LD.	202

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Fragmento amplificado de longitud polimórfica)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	ARN de doble cadena
ARNss	ARN de cadena sencilla
ATP	Adenosin trifosfato
BCA	Biological Control Agents (Agentes de control biológico)
bp	Par de bases
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
C	Citosina
cm	Centímetro
ddH ₂ O	Distilled water, agua destilada
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate, desoxirribonucleótido trifosfato
D.O.	Denominación de Origen
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> , y colaboradores
f	Frecuencia alélica
FC	Fracción clonal
F _{st}	Índice del grado de diferenciación genética entre subpoblaciones o bien es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación.
G	Guanina
G	Índice diversidad genotípica
G/N	Diversidad genotípica normalizada
g/L	Gramo por litro
G _{st}	Medida de la diferenciación entre poblaciones
h	Hora
h	Diversidad génica de Nei
ha	Hectárea
hl	Hectolitro
H _o	Heterocigosidad observada
H _e	Diversidad génica
H _s	Media de las heterocigosidades esperadas en todas las subpoblaciones
H _t	Heterocigosidad esperada en la población en su conjunto
H _T	Diversidad genética total de la población
IA	Índice de asociación
ΔK	Número real de poblaciones
K	Número de agrupamientos
KH ₂ PO ₄	Fosfato potásico
Kb	Kilobases (1000 pares de bases)
LD	Desequilibrio de ligamiento
LTR	Long Terminal Repeat (Repetición terminal larga)
LINE	Long interspersed (transposable) elements
Mb	Megabase (1000 kb)
MCMC	Cadena de Markov Monte Carlo
MEA	Malt Extract Agar (Agar extracto de malta)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio

ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	ARN mensajero
MITE	Miniature inverted-repeat transposable elements
N	Haploide
N+N	Dicariótico
N	Número de haplotipos
na	Número de alelos observados
NaCl	Cloruro de sodio
ne	Número efectivo de alelos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
ORF	Open Reading Frame (marco de lectura abierta)
P	Probabilidad
p y q	Frecuencias alélicas de los alelos alternativos de un gen
p/v	Peso/volumen
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDA	Potato Dextrose Agar
PLP	Porcentaje de loci polimórficos
QTLs	Quantitative Trait Loci (Loci de variación continua)
r	Coeficiente de correlación cofenética
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA fragments (Fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar)
r_d	Índice de asociación (r_d introduce factores correctores para reducir el efecto y la dependencia del tamaño de la población)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica)
rfu	Unidad relativa de fluorescencia
rpm	Revoluciones por minuto
SCAR	Sequence Characterized Amplified Fragment (Fragmentos amplificados de Secuencia conocida)
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un único nucleótido)
SINE	Short interspersed (transposable) elements
T	Timina
TIR	Terminal Inverted Repeat, (Repeticiones terminales invertidas)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
$\mu\text{g/ml}$	Microgramos por mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromolar
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
UV	Ultravioleta
V_o	Varianza observada
V_e	Varianza esperada
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (Repeticiones en tándem en número variable)
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

RESUMEN

España tiene el viñedo más extenso del mundo y ocupa el tercer lugar en la lista de países productores de vino a nivel mundial. En Castilla y León la vid es un cultivo estratégico. En la actualidad los factores que limitan de manera más importante la producción de vid en nuestra Comunidad se derivan de los efectos de patógenos en campo. *B. cinerea* es uno de los principales patógenos de la vid y en Castilla y León afecta de manera muy notable a este cultivo. Si las condiciones climáticas lo favorecen, *B. cinerea* puede tener efectos devastadores y determinar pérdidas de hasta el 50-70% de la cosecha. La utilización de procedimientos de control basados en la aplicación de tratamientos químicos haciendo uso de fungicidas es una práctica cada vez menos recomendada y, sobre todo, menos aceptada. 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, saludable y respetuosa con el medio ambiente. Frente a este tipo de prácticas más convencionales se hace necesario desarrollar procedimientos y métodos de control de las enfermedades en campo alternativos, lo que exige profundizar en el conocimiento de la biología del patógeno y de la dinámica de sus poblaciones. Estas consideraciones cobran especial importancia cuando se trata de patógenos que muestran una gran diversidad y adaptabilidad, como es el caso de *B. cinerea* y de sus poblaciones naturales.

En este trabajo nos hemos planteado profundizar en la caracterización de las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León, en particular evaluando la diversidad fisiológica y genética existente en las mismas y determinando la forma en que esta diversidad genética se estructura. Para la recolección de muestras hemos seleccionado áreas productoras importantes y de gran tradición vitivinícola de nuestra Comunidad Autónoma. Se trata de las D.O. Ribera del Duero, Toro, Cigales y Rueda. Hemos incluido también dos áreas localizadas en nuestro entorno más próximo, en la provincia de Salamanca, en las que del cultivo de la vid se está derivando una notable actividad económica local y en las que se mantienen algunas variedades de vid autóctonas, muy poco utilizadas, y cultivadas en muchos casos de forma artesanal: la D.O. Arribes del Duero y la Zona de Vinos de la Tierra Sierra de Salamanca. Dentro de estas zonas productoras hemos seleccionado una serie de municipios y viñedos representativos. Fruto del trabajo de muestreo llevado a cabo hemos generado una colección numerosa de aislados obtenidos cubriendo un espacio geográfico amplio y en el que se ha trabajado con un buen número de variedades de vid, desde las más comunes y comerciales hasta algunas cultivadas de forma muy localizada y restringida. Disponemos así de aislados de *B. cinerea* recogidos sobre las variedades Garnacha, Juan García, Malvasía, Rufete, Tempranillo, Tinta de Toro, Verdejo, Viura, Bruñal, Gajo Arroba, Sauvignon Blanc, Tempranillo Blanco, Moscatel, Pedro, Merlot, Malvec, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Albillo, Petit Verdó, Syrah, Jeromo, Bastardillo, Jerez Palomino, Maldón, Pipajo y Mazuelo.

Nuestro trabajo demuestra la gran incidencia de *B. cinerea* en los viñedos de Castilla y León. En la campaña de 2007, en todos los viñedos visitados fue posible constatar la ocurrencia de podredumbre gris y en un 84% de los racimos recogidos y analizados fue posible detectar la presencia de propágulos de *B. cinerea* que pudimos recuperar y purificar. Un 17% de los racimos infectados resultaron ser racimos asintomáticos en los que *B. cinerea* estaba presente pero aún no se habían hecho evidentes los síntomas de infección. En la mayor parte de los racimos analizados y en los que se purificó *B. cinerea*, fue posible obtener varios aislados. En algunos casos del mismo racimo se obtuvieron aislados idénticos, considerados clones, pero en la mayor parte de los racimos analizados se purificaron varios aislados que resultaron ser genéticamente diferentes. Estas observaciones constituyen indicaciones claras de que en los racimos de nuestros viñedos se están produciendo con mucha frecuencia infecciones múltiples.

La colección de aislados de campo de *B. cinerea* recogidos sobre vid en la recolecciones llevadas a cabo durante las campañas 2002 y 2007 incluye 626 aislados. Para la caracterización de diversidad fisiológica y genética en las poblaciones del patógeno de los viñedos de nuestra Comunidad Autónoma se ha seleccionado una población de trabajo de 316 aislados de campo que constituye una muestra representativa y equilibrada de aislados recogidos en las distintas zonas productoras.

La caracterización fisiológica de los aislados seleccionados se ha centrado en la evaluación de la capacidad de cada uno de ellos para infectar a un huésped de carácter general y de fácil manejo en el laboratorio, la judía, y de su capacidad de crecimiento saprofito. Los análisis llevados a cabo con la colección de aislados en su conjunto en relación con ambos caracteres indican que existe una gran diversidad fisiológica en los dos casos en las poblaciones del patógeno recogidas en los viñedos de Castilla y León, y que ambos son caracteres de tipo cuantitativo, de variación continua, en cuya determinación participan varios genes. La correlación entre los dos caracteres es moderadamente elevada, lo que supone que la variación observada en el crecimiento saprofito de los aislados explica una parte importante de la variación observada en la capacidad para infectar judía.

Además de la agresividad de *B. cinerea* sobre judía, y con el objeto de profundizar en el análisis del carácter "agresividad" o "virulencia" de este patógeno y de abordar el estudio de su naturaleza como patógeno generalista, en este trabajo hemos evaluado la agresividad sobre tomate y la agresividad sobre una serie de variedades representativas de vid. En este caso, utilizando una muestra representativa de aislados seleccionados en función de su agresividad sobre judía y que incluye aislados muy agresivos, aislados moderadamente agresivos y aislados muy poco agresivos o "no patógenos", ha sido posible obtener evidencias que indican (1) que *B. cinerea*, como población de individuos, es ciertamente un patógeno generalista; (2) que sobre cada huésped la población de individuos seleccionados muestra variación en el carácter "agresividad" en *B. cinerea*; y (3) que el perfil de patogenicidad que dibuja el conjunto de aislados seleccionados sobre cada huésped es diferente y específico, lo que sugiere que

cada huésped presenta una configuración particular de factores que median en la susceptibilidad/resistencia del huésped al patógeno. Por otra parte, la valoración de la respuesta de los distintos huéspedes analizados a los aislados estudiados permite proponer (1) que la vid (en general) es una especie de planta huésped con un nivel de resistencia a *B. cinerea* superior al de la judía y el tomate, una mayor resistencia que es consecuencia, en gran medida, de una mayor capacidad para limitar el ingreso del patógeno, y (2) que las variedades blancas muestran un nivel de resistencia frente a *B. cinerea* superior al que muestran las variedades tintas analizadas en nuestro trabajo.

El análisis conjunto de los datos generados permite concluir que la población de aislados de *B. cinerea* que hemos caracterizado fisiológicamente está integrada mayoritariamente por aislados que pueden ser considerados como patógenos generalistas que pueden infectar los tres huéspedes analizados (y en el caso de la vid, las siete variedades utilizadas en nuestro estudio), aunque muestran diferencias en el grado en que causan la infección en cada huésped particular. Pero en la población se identifican también, aunque en una proporción pequeña, aislados "no patógenos", incapaces de infectar ninguno de los huéspedes considerados, y aislados con comportamientos que permiten proponer cierto grado de adaptación a un huésped particular.

El conjunto de aislados caracterizados fisiológicamente ha sido analizado también desde la perspectiva de la genética de poblaciones con un doble objeto: (1) caracterizar genéticamente los individuos que la integran y evaluar las relaciones de similitud genética entre ellos, y (2) cuantificar la variabilidad genética existente y determinar el modo en el que esta variabilidad se estructura en las poblaciones naturales del patógeno. Hemos comprobado que se trata de una población integrada exclusivamente por aislados de tipo II, portadores de trasposones. Haciendo uso de un juego amplio de marcadores moleculares de tipo AFLP, y una vez estimados los coeficientes de similitud genética, ha sido posible comprobar que la gran mayoría de aislados analizados (un 97%) conforman una gran población sin una estructura evidente, no pudiéndose apreciar una organización y agrupamiento de aislados claros ni por D.O. ni por variedad de vid. Es interesante destacar, no obstante, que se detecta un grupo de individuos muy poco numeroso que muestra diferencias genéticas muy notables con el resto de la población.

En su conjunto constituye una población con una gran diversidad genética, como indican los valores obtenidos en todos los índices analizados, en particular el valor de Diversidad Genotípica, de Diversidad Genotípica Normalizada y de la Fracción Clonal. Ello supone que se trata de una población con una elevada variabilidad genética y con una gran riqueza genética, lo cual constituye un argumento en favor de la ocurrencia de reproducción sexual del hongo en el campo en los viñedos de nuestra comunidad autónoma, y por lo tanto de recombinación, como mecanismo que genera variabilidad genética en esta población. No obstante, ha sido posible identificar clones, aunque sea en número reducido; y se obtienen valores significativos de desequilibrio de ligamiento en la población en su conjunto y en todas

las subpoblaciones consideradas atendiendo a los distintos criterios tenidos en cuenta en este trabajo, observaciones que sugieren fuertemente que la reproducción asexual tiene lugar en el campo, probablemente de forma preferente teniendo en cuenta la capacidad de esporulación de *B. cinerea*. Ambos tipos de reproducción, por lo tanto, parecen tener lugar en las poblaciones naturales de *B. cinerea* de los viñedos de nuestra comunidad autónoma.

Los análisis de evaluación de diferenciación genética atendiendo a las poblaciones establecidas en función del criterio geográfico, es decir, la D.O. en la que se ubica el viñedo en el que se realizó el aislamiento, permiten determinar un valor del Coeficiente de Diferenciación indicativo de una diferenciación baja, pero no nula. Por lo tanto, la población en su conjunto muestra un nivel importante de uniformidad, pero el factor D.O. determina o condiciona una cierta estructuración. Quizás las restricciones al movimiento de materiales vegetales entre D.O. que se han ido imponiendo con el objeto de garantizar que se elaboran productos, en este caso, vinos, de características propias y peculiares con uvas cultivadas de viñedos seleccionados y acogidos a cada D.O. determinen un cierto nivel de diferenciación en la población. Pero, ciertamente, el grado de diferenciación que determinan es menor. A contrarrestar y compensar este efecto de diferenciación puede contribuir la facilidad de dispersión que tienen un hongo como *B. cinerea*. El alto valor de número de migrantes que se obtiene en nuestro análisis puede estar apuntando precisamente en esta dirección. Una situación similar se deriva del análisis AMOVA. Éste demuestra que la mayor parte de la variación total observada en las poblaciones (un 94,8%) tiene su origen en la variación dentro de las poblaciones y que un porcentaje muy reducido (5,20%) de la variación tiene su origen en las diferencias entre poblaciones. El factor "variedad de vid de origen" y el factor "temporal" tienen un impacto menor a la hora de determinar una posible diferenciación entre poblaciones.

Es interesante destacar que nuestro análisis permite detectar una población minoritaria dentro de la población global, integrada por individuos de características particulares (incluye un buen número de aislados muy poco agresivos sobre judía), que presenta una diferenciación notable en relación con aquélla y con la que muestra un flujo genético muy limitado. La población general, en consecuencia, no es absolutamente panmíctica. La caracterización de los individuos que integran esta población abre una vía de investigación que atrae el interés del grupo de investigación y que centra futuras propuestas de investigación.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de plantas pueden ser causadas por virus, viroides, bacterias, fitoplasmas, hongos, nematodos, protozoos, algas y plantas parásitas. Pero el mayor grupo de organismos fitopatógenos es el de los hongos. Esto hace que la situación difiera considerablemente en relación con lo que sucede cuando se consideran los patógenos humanos, sistema en el que la mayoría de los patógenos son bacterias y virus (Trigiano *et al.*, 2010).

Los patógenos pueden ser clasificados en diversos grupos como: biotróficos (necesitan tejido huésped vivo para completar su ciclo de vida), saprófitos facultativos (frecuentemente se comportan como saprófitos), parásitos facultativos (es el saprófito facultativo que en condiciones determinadas tornase un parásito) y necrotrofico (matan antes de alimentarse de las células o contenidos celulares).

Los hongos tienen características específicas que los diferencian de los demás grupos de organismos fitopatógenos. Así, se trata de organismos eucarióticos y aclorofilados. En general, son organismos filamentosos, ramificados, que se reproducen a través de esporas y que poseen paredes celulares de quitina y otros polímeros. La mayor parte de su vida transcurre en estado haploide (N) o dicariótico (N+N). Los hongos son generalmente clasificados según su estadio o forma teleomorfa (sexual).

Los filamentos de los hongos, que tienen forma de hilo, son conocidos como hifas y su conjunto como micelio. Las esporas son los cuerpos reproductivos o propagativos de los hongos. Las esporas pueden ser producidas en el estado anamórfico (asexuado) de dos maneras: dentro de un esporangio (las esporas producidas de esta manera son conocidos como esporangiosporas) o en los extremos de hifas especializadas denominadas conidióforos (las esporas producidas así son conocidas como conidios, p.e. en *Botrytis cinerea*).

Los hongos forman estructuras asexuadas de supervivencia como las clamidosporas (estructuras de reposo de pared espesa que pueden tener incluso una pared celular doble) o esclerocios (que son hifas prensadas fuertemente formando estructuras de formas variadas, duras, fuertemente melanizadas y muy resistentes a las condiciones ambientales adversas, p.e. en *B. cinerea*).

1 - *BOTRYTIS CINEREA*

1.1 - ASPECTOS GENERALES

Botrytis spp. es un género de hongo filamentososo, cuyas especies son conocidas por su capacidad para atacar a muchas plantas hospedadoras y su presencia en todos los climas del mundo. Normalmente se encuentra en áreas tropicales y subtropicales pero se han descrito casos extremos. Así, la especie *B. cinerea* ha sido encontrada en Alaska en 1924 (Anderson, 1924) y en el desierto por Yunis y Elad en 1989 (Yunis and Elad, 1989).

Infecta principalmente la parte aérea de las plantas (hojas, flores, frutos, yema y tallo), pero también puede atacar a semillas, bulbos y otros materiales de propagación vegetativa, en viveros de plantas, en hortalizas, sobre ornamentales, en el campo y huertos, y también ataca a productos transportados y almacenados (Elad *et al.*, 2004). La gran variedad de síntomas que determina en los distintos órganos de la planta y en tan numerosas especies puede sugerir que *B. cinerea* posee un gran “arsenal de armas”, muy rico y diverso, para atacar las plantas hospedadoras (Choquer *et al.*, 2007).

Las plantas monocotiledóneas son huéspedes específicos de algunas especies de *Botrytis* spp., tales como *B. fabae*, *B. squamosa* y *B. tulipae*, que atacan sólo haba, cebolla y tulipán, respectivamente. *B. cinerea* es una excepción en el género, ya que no tiene ninguna especificidad en relación a la planta huésped y causa grandes pérdidas económicas en muchos cultivos. De ello se deriva el gran interés que tiene profundizar en la caracterización de este importante patógeno.

La gama de síntomas que *Botrytis* puede causar en sus huéspedes es muy diversa, desde pequeñas lesiones necróticas secas hasta grandes lesiones húmedas o dispersivas o podredumbres totales de los tejidos infectados, con o sin la aparición de micelio esporulando en su superficie. El factor limitante para el brote de la epidemia es normalmente la ocurrencia de un microclima adecuado y la presencia de una fuente de inóculo.

B. cinerea es un hongo con una incidencia importante en España y estudiado por distintos grupos de investigadores desde distintas perspectivas, ya que es responsable de notables pérdidas económicas en cultivos importantes en varias regiones de nuestro país. Este hongo causa grandes pérdidas en las producciones protegidas de Almería, en el sureste de España, donde los viveros de plástico cubren un área de aproximadamente 30000 ha (Alfonso *et al.*, 2000). Según Melgarejo, *B. cinerea* es el agente causal de una de las enfermedades más importantes en los cultivos protegidos debido por una parte a su alta incidencia y por otra a su difícil control, que es realizado exclusivamente con productos químicos en cultivos hortícolas protegidos (Melgarejo *et al.*, 2002). En los trabajos de Rebordinos *et al.* (2000) y Vallejo *et al.* (1996 y 2001), se describe la caracterización de cepas de *B. cinerea* aisladas de *V. vinifera*, *C.*

sativus y *V. faba* de distintas partes de España, lo que demuestra la presencia de este patógeno en varios cultivos de este país. Es un problema importante también en el cultivo de fresa en Huelva. En Castilla y León, la vid es el cultivo más afectado por el ataque de *B. cinerea*.

1.2 – SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN

El género *Botrytis* es uno de los géneros de hongos más antiguos, descrito inicialmente por Michaeli en 1729. Pero la enfermedad que causa *B. cinerea*, "la podredumbre gris", es conocida desde la antigüedad. Ya fue identificada por Plinio "el viejo", un científico apasionado, entre otras muchas cosas, en el primero siglo de nuestra era.

El género *Botrytis* Persoon comprende dos clados en los que se agrupan 22 especies reconocidas y un híbrido (Staats *et al.*, 2005): el primero incluye cuatro especies que atacan únicamente especies de dicotiledóneas (*B. cinerea* se incluye en ese clado) y el segundo que contiene 18 especies que atacan principalmente a monocotiledóneas (Choquer *et al.*, 2007). Antes del desarrollo y la utilización de técnicas moleculares para la detección de variabilidad genética, ampliamente difundidas y empleadas en la actualidad, fueron los estudios basados en el análisis de características morfológicas, especialmente relacionadas con la ontogenia del macroconidio, y de las relaciones de patogenicidad de las distintas especies dentro del género con diferentes especies de plantas huésped los que generaron los criterios más ampliamente utilizados para delinear las especies incluidas en el mismo (Jarvis, 1977).

B. cinerea está clasificada en el Reino de los hongos, en el Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, en el Orden *Leotiales* (antes *Helotiales*), Familia *Sclerotiniaceae*, Género *Botryotinia*, siendo clasificada su forma sexual como *Botryotinia fuckeliana*. *B. cinerea* es el nombre de la forma asexual de esta especie, el anamorfo (Williamson *et al.*, 2007). Aunque normalmente se conoce a los hongos por el nombre del estado sexual, en el caso de *B. cinerea* es el nombre del estado asexual el que se utiliza a todos los niveles para identificar al patógeno (XIth Internacional *Botrytis* Symposium, 1996, Wageningen, The Netherlands).

B. cinerea tiene en media 16 cromosomas (Shirane *et al.*, 1988; Faretra and Grindle, 1992) y es un organismo haploide en su fase micelial. Es considerado un necrotrofo genuino, pues responde a los criterios clásicos para ser considerado como tal: ataca a numerosos huéspedes diferentes, secreta muchos enzimas degradantes de la pared celular y compuestos fitotóxicos de bajo peso molecular, mata rápidamente el tejido del huésped y es capaz de extraer nutrientes de tejidos muertos (Tudzynski and Kokkelink, 2009).

1.3 – CICLO DE VIDA

En el ciclo de vida de *B. cinerea* podemos distinguir una fase asexual y una fase sexual (Figura 1). Como ascomicete típico, *B. cinerea* presenta un micelio tabicado, incoloro cuando se desarrolla en el interior de la planta huésped y de color marrón oliva que forma masas algodonosas de hifas de 11-23 μm de diámetro, hifas ramificadas y entrelazadas cuando crece sobre el tejido vegetal o cuando se cultiva sobre medios sintéticos. Este micelio genera también hifas aéreas especializadas en cuyos extremos se diferencian los conidióforos. Estos conidióforos, de 1-3 mm de largo, se ramifican profusamente para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios, dando el aspecto de racimo engrosado y arborescente cargado de macroconidios característico de la especie (ver Figura 2). Estos conidios (con un tamaño de 10-12 \times 8-10 μm) son ovoides o globulosos, lisos, unicelulares y ligeramente grisáceos, pudiendo contener normalmente entre 5-10 núcleos. La formación de conidios está estimulada por longitudes de onda específicas (Epton and Richmond, 1980), por lo que es práctica común exponer el micelio del hongo a luz en las longitudes de onda del ultravioleta cercano para favorecer la inducción de la esporulación sobre medios sintéticos. Estos macroconidios son dispersados fácilmente por el aire y por el agua, o por insectos, y en condiciones apropiadas (humedad relativa alta y temperaturas templadas) germinan rápidamente produciendo micelio que reinicia el ciclo asexual. Constituyen, por lo tanto, las esporas vegetativas, asexuales del hongo y son su principal mecanismo de dispersión. El hongo también puede producir un segundo tipo de conidio a partir de micelio viejo, éste, de menor tamaño (de 2 a 3 μm de diámetro), unicelular y esférico, y denominado microconidio.

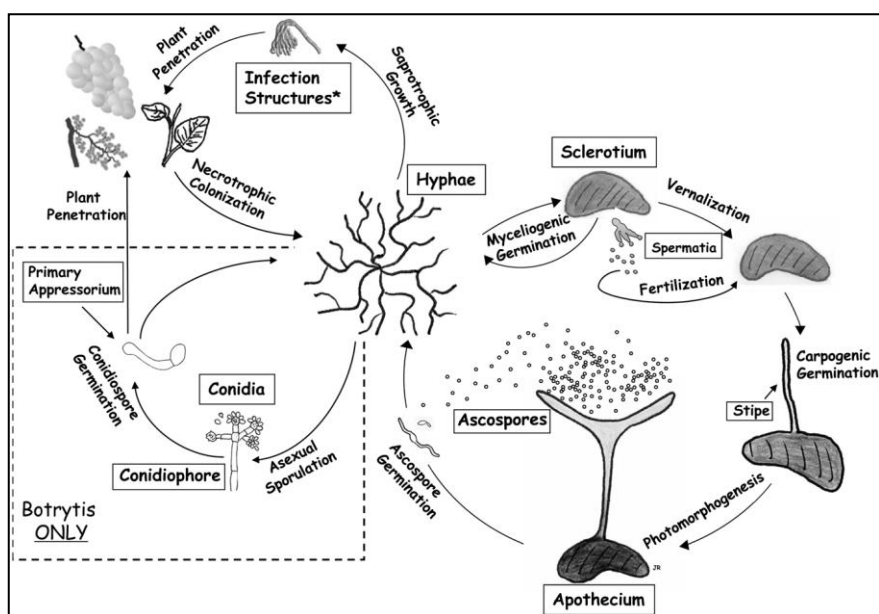


Figura 1. Ciclo de vida de *B. cinerea* (Tomado de Anselem *et al.*, 2001).

Cuando las condiciones ambientales o climáticas se vuelven desfavorables (por ejemplo, en la naturaleza durante el otoño y al principio del invierno), el micelio produce esclerocios negros, discoidales, con un tamaño de 2-4 × 1-3 mm y fuertemente sujetos al sustrato. Estas estructuras de resistencia representan un importante mecanismo de supervivencia y suelen ser de color blancuzco al principio, oscureciéndose posteriormente. Están formados por una médula de filamentos de micelio agregados y de una cubierta de células corticales melanizadas que protege al micelio del interior de la desecación, de la radiación ultravioleta y del ataque de microorganismos durante largos periodos de tiempo (Backhouse and Willetts, 1984). Normalmente, estos esclerocios se hacen confluyentes dando la impresión de poseer mayor tamaño. Superadas las condiciones desfavorables, el esclerocio germina y se desarrolla produciendo de nuevo micelio. En cultivo *in vitro* sobre medios sintéticos el micelio se desarrolla muy rápidamente, con un color blanco que cambia posteriormente a un marrón oliva. A temperaturas inferiores a 15°C el micelio produce numerosos esclerocios. A temperaturas superiores a 15°C, el micelio esporula profusamente produciendo conidios de color gris.

Los microconidios y los esclerocios juegan un papel fundamental en el ciclo sexual del hongo. La mayoría de los aislados de campo de *B. cinerea* son heterotálicos, es decir, pertenecen a una de dos formas sexuales alternativas, determinadas cada una de ellas por la presencia de una u otra forma alélica del gen responsable del tipo sexual: el alelo *MAT1-1* o el alelo *MAT1-2* (Faretra *et al.*, 1988). Cuando aislados de tipo sexual diferente coinciden y las condiciones ambientales lo permiten es posible iniciar el ciclo sexual. No obstante, también se han descrito aislados, con muy poca frecuencia, capaces de reaccionar sexualmente con los dos tipos sexuales descritos (Faretra and Pollastro, 1996; van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993). Los microconidios tienen como función la espermatización (actúan como parental masculino en el cruzamiento) de los esclerocios de cepas de sexo diferente (que actúan como parental femenino). La “fecundación” de estos esclerocios desencadena el ciclo sexual, produciéndose apotecios (Figura 2) con ascas que contienen 8 ascosporas binucleadas derivadas de una meiosis. Estas ascosporas son proyectadas al exterior por un poro apical que se forma en la madurez por la presión osmótica de las vacuolas del citoplasma. Las ascosporas germinan originando un micelio que reinicia el ciclo asexual (o sexual) y que, en su caso, también puede infectar a la planta huésped. Aunque ciertamente la forma sexual del hongo ha sido descrita y tiene lugar en la naturaleza, son muy escasas las notificaciones sobre la formación o recolección de apotecios en el campo y son raros, o totalmente ausentes en muchos casos, en la mayoría de los cultivos atacados por *B. cinerea*. Estos apotecios son más comunes en otras especies del género.

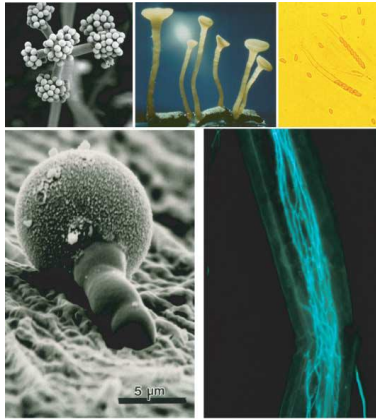


Figura 2. *B. cinerea* en distintas fases de su ciclo de vida. Desde arriba a la izquierda en sentido horario: conidióforo con esporas, apotecios, 2 ascas con 8 ascosporas, micelio infectando a una planta y espóra germinando (tomado de Williamson *et al.*, 2007).

1.4 – CICLO DE INFECCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

Tanto las esporas asexuales como las esporas sexuales pueden infectar al huésped. La Figura 3 presenta de forma general y simplificada el ciclo de infección de *B. cinerea*. Como podemos intuir, los conidios constituyen la forma de propagación más importante del patógeno durante el periodo vegetativo de la planta huésped, mientras que los esclerocios y el propio micelio son los responsables de la supervivencia y su reproducción de un año al otro. Los conidios generados en los focos primarios de la infección siguen unos ciclos muy bien definidos de generación, producción y diseminación, regulados por las fluctuaciones en la temperatura y la humedad que se dan a primeras horas de la mañana (Jarvis, 1962).

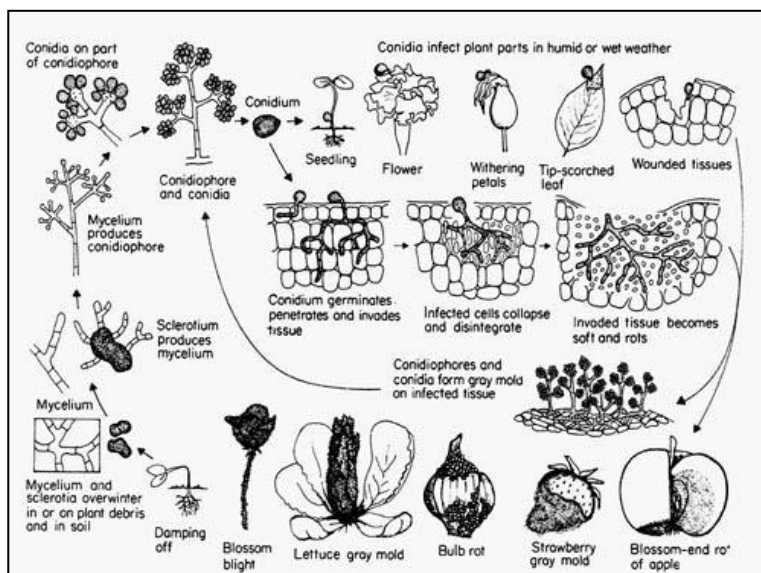


Figura 3. Ciclo de infección de *B. cinerea*.

El ciclo de infección general de *B. cinerea* sobre la planta huésped comienza cuando los conidios, que pueden ser transportados incluso a grandes distancias por corrientes de aire o por insectos, alcanzan la superficie del huésped. Si las condiciones ambientales lo permiten, el conidio germina y se inicia el desarrollo germinativo que se abre camino por la superficie del huésped. El conidio germinado se adhiere fuertemente a la superficie de las células vegetales. En muchas especies vegetales, no en todas, se diferencian estructuras de penetración consistentes en hinchamientos de los extremos de los tubos germinativos, similares, aunque no idénticos, a los apresorios descritos en otras especies de hongos fitopatógenos. La formación de apresorios por *B. cinerea* está confirmada tanto por estudios citológicos (Tenberge, 2004) como genéticos (Gourgues *et al.*, 2004), así como la formación de una matriz extracelular alrededor de la zona de penetración. Tanto la longitud del tubo germinativo como la secreción de la matriz extracelular pueden verse incrementados si los conidios son inoculados en suspensiones acuosas, en comparación con las inoculaciones en seco (Cole *et al.*, 1996). Los apresorios formados por *B. cinerea* son distintos a los formados por las especies de los géneros *Colletotrichum* o *Magnaporthe*, en cuanto que, a pesar de contener melanina en la matriz celular asociada a la pared celular fúngica (Doss *et al.*, 2003), carecen de septo que aisle el apresorio del tubo germinativo, tan necesario para generar las altas presiones osmóticas que se dan en el caso de *M. grisea*. Por esta razón es poco probable que los apresorios de *B. cinerea* sean suficiente por sí solos, aunque sí resulten necesarios (Gourgues *et al.*, 2004), para que la penetración en el tejido del hospedador tenga lugar con éxito. En otros casos parece producirse una penetración directa a través de la cutícula y de la pared celular en la que participan distintos enzimas que degradan componentes de la pared.

En plantas de frutos pequeños, los órganos florales son sitios importantes para el inicio de la infección (Figura 3). En algunos tipos de flores, el fluido estigmático se convierte en un medio nutritivo para el conidio. Incluso el tubo germinativo puede abrirse paso hasta el ovario siguiendo el camino que crean los tubos polínicos. Los pétalos de las flores infectadas son elementos importantes en el ciclo de infección en muchos cultivos, ya que se convierten en vehículos del inóculo al ser arrancados por el viento y funcionando como productores de inóculos de segunda generación (Johnson and Powelson, 1983). La humedad relativa es un elemento crucial para el éxito de la infección, como sucede por ejemplo en pétalos de rosas (Williamson *et al.*, 1995). Una continua exposición a humedad relativa alta conduce a una serie sucesiva de ciclos de infección y esporulación, haciendo que el cultivo se pierda completamente. Los insectos tienen también un papel importante en el ciclo de infección de *B. cinerea*, no sólo como agente de dispersión de los conidios, sino también como causantes de lesiones en los tejidos vegetales que sirven de entrada al patógeno.

Una vez el hongo ha penetrado en el tejido vegetal, la muerte de células adyacentes al punto de penetración y la formación de una lesión primaria como consecuencia de la respuesta de defensa de la planta, determinan el establecimiento del patógeno. En este momento, se inicia una fase de latencia durante los cuales los mecanismos de defensa parecen controlar al patógeno, permaneciendo localizado en áreas de necrosis que se corresponden con las

lesiones primarias. Transcurrido un tiempo, y sólo en algunos casos, el hongo es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación por el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar de nuevo el ciclo de infección.

En invierno, el hongo se conserva en forma de esclerocios en tejidos senescentes del hospedador o bien como micelio sobre restos de tejido vegetal o semillas. Cuando las condiciones climáticas empiezan a ser favorables en primavera, el hongo empieza a crecer para producir conidióforos y conidios multinucleados, que serán diseminados por el viento por la lluvia y por insectos. Estos macroconidios van a germinar en la superficie del tejido huésped o sobre un sustrato adecuado, iniciándose la infección y propagación de la enfermedad. De esta manera se origina nuevo micelio con capacidad de esporular, completándose el ciclo de propagación vegetativa.

Con frecuencia *B. cinerea* entra en contacto con los tejidos del huésped pero no desencadena la enfermedad y no manifiesta síntoma alguno, en particular si las condiciones ambientales no son las más favorables para el desarrollo del patógeno. Pero éste no es eliminado: permanece en estado latente durante periodos de tiempo que pueden ser prolongados. Estas infecciones latentes suelen iniciarse durante la floración, en particular si el periodo de floración tiene lugar en condiciones de humedad baja. Luego el patógeno puede pasar en forma latente toda la fase de desarrollo y maduración de los frutos, incluso hasta después de la recolección. Si entonces las condiciones son favorables, el patógeno reinicia su actividad, se alimenta de los tejidos ricos en nutrientes de los frutos y desencadena la enfermedad, a menudo durante la fase de postcosecha, con efectos devastadores.

Un problema añadido en el caso de *B. cinerea* a la hora de considerar la epidemiología del patógeno se deriva de su amplísimo rango de huéspedes (más de 200 especies distintas) y de su capacidad para infectar prácticamente todo tipo de tejidos y órganos de la planta (van Kan, 2006). Aunque se apliquen en cada caso las medidas que se consideran más apropiadas para eliminar fuentes de inóculo y para controlar el patógeno en un momento dado, sobre un cultivo en particular y en unas condiciones concretas, dada su ubicuidad, su facilidad para ser transportado y su enorme capacidad de multiplicación (en cultivos más o menos próximos de la misma o de otra especie) el control del patógeno es ciertamente difícil. En la sección 1.6 se resumen distintos aspectos sobre las posibilidades de control del patógeno sobre las que se ha trabajado más intensamente en los últimos años.

1.5 – DIVERSIDAD GENÉTICA

B. cinerea ha sido descrito como un hongo con una gran plasticidad debido a la gran variabilidad fenotípica que se observa en sus poblaciones en aspectos tales como su crecimiento (Grindle, 1979), su capacidad de supervivencia en diversos ambientes, la rápida adquisición de resistencia a fungicidas químicos (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 1996), su patogenicidad (Lorenz, 1983) y la manera de obtener nutrientes a partir de las células del hospedador. Esta variabilidad fenotípica supone la existencia de una variabilidad genética, cuyos mecanismos generadores aún no se entienden en su totalidad. Indudablemente, es la mutación la fuente última de variación genética. En el caso de *B. cinerea* se discute la contribución de diversos procesos adicionales a la generación de variación genética y a la reorganización de generación en generación de la variación ya existente, entre ellos la naturaleza heterocarionte que presentan con frecuencia los aislados de campo, una ploidia compleja, la presencia y actividad de una gran variedad de elementos génicos extracromosómicos, la existencia de compatibilidad somática y la ocurrencia de una fase sexual en su ciclo de vida. Probablemente todos estos mecanismos operan simultáneamente y contribuyen en medidas diferentes a generar la gran variabilidad genética que se observa en las poblaciones naturales del patógeno y que se estructura modelada por distintos tipos de factores. Entre las especies del género *Botrytis spp.*, la especie *B. cinerea* es la que presenta mayor variación genética y fenotípica.

A continuación presentamos algunos elementos de información sobre el modo en que estos procesos contribuyen a generar variabilidad genética en las poblaciones de *B. cinerea*.

1.5.1 – NÚMERO DE NÚCLEOS Y CROMOSOMAS

El hongo *B. cinerea* tiene células multinucleadas, como las hifas y los conidios, y también presenta células uninucleadas, como los microconidios, que tienen función de gametos masculinos y que raramente germinan en condiciones de laboratorio. Todas esas estructuras mencionadas anteriormente son haploides. Las ascosporas, también haploides y mononucleadas, se forman en el interior de las ascas, y derivan de un diploide transitorio que se origina mediante la fusión de núcleos de tipos sexuales compatibles una vez se ha producido la fecundación de un esclerocio por un microconidio, que originará un apotecio, en el que se formarán las ascas.

Los hongos por regla general tienen un genoma pequeño, del orden de 30 - 40 Mb, lo que dificulta la caracterización de su cariotipo utilizando técnicas citológicas. A pesar de ello, Shirane *et al.* (1988), lograron caracterizar los cromosomas de *B. cinerea* evidenciando la

presencia de 16 cromosomas en la metafase mitótica. También han sido detectados 16 cromosomas en ascas en desarrollo (Faretra and Grindle, 1992).

La técnica conocida como electroforesis de campo pulsado es ideal para resolver los pequeños genomas de los hongos y reveló un alto grado de polimorfismo en la longitud de los cromosomas (Zolan, 1995). También permitió demostrar que los cromosomas supernumerarios son comunes en *B. cinerea* (Covert, 1998). Esa técnica ha permitido determinar la presencia de 13 grandes bandas (en un rango de tamaño entre 1.8-4.6 Mb), que corresponden a uno o más cromosomas grandes, junto con tres pequeñas bandas (en un rango de 220-580 Kb) que corresponden a cromosomas pequeños y a ADN mitocondrial (van Kan *et al.*, 1993; Faretra *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 1996, 2002; Beever and Weeds, 2004). Es interesante destacar que los trabajos de distintos autores indican que existen polimorfismos en los cariotipos electroforéticos de cepas de campo del patógeno (Vallejo *et al.*, 2002).

Además de tener en cuenta que *B. cinerea* es multinucleado, aunque posee estructuras mononucleadas, y que existe variación en cuanto al número y tamaño de los cromosomas que constituyen su complemento cromosómico en distintas cepas de campo, debemos considerar que se han descrito diferencias en los niveles de ploidía entre cepas. Distintos estudios han revelado que cepas de *B. cinerea* originadas de ascosporas son inicialmente haploides, pero que conforme éstas crecen, pueden dar lugar a colonias heteroploides. Esta situación puede ser debida a que el proceso de cruzamiento sexual actúa restringiendo la participación de núcleos haploides, mientras las células somáticas estimulan la heteroploidía (Beever and Weeds, 2004). Mediante un ensayo utilizando microscopia de fluorescencia, Büttner *et al.* (1994) determinaron que la cepa SAS56 es poliploide, quizás triploide, y que las cepas derivadas de ella mediante tratamiento con benomilo presentan distintos grados de euploidía, o más bien aneuploidías. La cepa SAS405 parece tener un contenido de DNA 0.69x en relación con la cepa SAS56, siendo posible que sea diploide. Fueron estudiadas cepas de campo, que demostraron ser de diferentes contenidos cromosomales, bien mayor, bien menor, que SAS56 (Büttner *et al.*, 1994). Todos esos estudios son vistos como evidencia de que existe cruzamiento sexual.

1.5.2 – EL CICLO SEXUAL EN LA NATURALEZA Y EN EL LABORATORIO

La recombinación meiótica que tiene lugar durante la formación de los gametos en organismos con reproducción sexual es considerada la fuente cuantitativamente más importante de variabilidad genética en sus poblaciones naturales. *B. cinerea* tiene una fase sexual en su ciclo de vida, como hemos indicado anteriormente, pero las estructuras características de la misma, los apotecios, raramente se encuentran en condiciones naturales, lo que en principio hace dudar de la posible contribución de la reproducción sexual como mecanismo generador de variabilidad genética en la naturaleza en esta especie.

No obstante, es posible realizar cruzamientos en el laboratorio entre aislados sexualmente compatibles y producir apotecios. En diversos estudios llevados a cabo con numerosos aislados de campo recogidos en lugares muy diversos del mundo se ha podido comprobar que la mayor parte de ellos son heterotálicos y que se pueden cruzar de manera efectiva con cepas probadoras previamente caracterizadas (Lorenz and Eichorn, 1983; Faretra *et al.*, 1988; Faretra and Pollastro, 1991, 1996).

La obtención del apotecio en condiciones de laboratorio en distintos trabajos ha permitido demostrar que la mayoría de las cepas de *B. cinerea* son heterotálicas, o sea, que son portadoras de una u otra de las alternativas alélicas del gen que determina el tipo sexual y el apareamiento. Por ejemplo, las cepas probadoras como la cepa SAS56 son portadoras en su genoma del alelo *MAT 1-1* y las cepas probadoras como la cepa SAS405 llevan el alelo *MAT 1-2*. La mayoría de las cepas de campo recogidas son normalmente aptas para actuar como hembra o como macho en cruzamientos, pero se han descrito cepas que son incapaces de producir esclerocios y que no pueden actuar como hembras. Se han descrito también cepas homotálicas, que producen apotecios fértiles sin la espermatización. Los autores (Faretra *et al.*, 1988) concluyeron que estas cepas, de tipo *MAT 1-1/2* (16% en su estudio) son pseudohomotáticas.

Para obtener datos sobre ligamiento en *B. cinerea*, como en cualquier otra especie, hay que cruzar cepas compatibles y obtener datos de segregación y cosegregación de marcadores genéticos para analizar y determinar la posición de genes conocidos en su mapa genético. Si, por ejemplo, dos genes están localizados muy próximamente en el mapa genético, estos genes muestran ligamiento y serán transmitidos juntos a los individuos descendientes, dando lugar a individuos portadores de combinaciones génicas idénticas a las de los parentales (o clones). Si los genes están localizados en posiciones distantes en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes, entonces tenderán a transmitirse independientemente. Cuanto más próximos entre sí, menor será la frecuencia de individuos portadores de combinaciones génicas nuevas en la descendencia: cuanto más alejados, mayor será esta frecuencia.

En estos principios básicos se basa el análisis de ligamiento en cualquier especie. En *B. cinerea* hasta la fecha se han realizado pocos estudios en relación con la utilización del cruzamiento sexual y el análisis de ligamiento. En uno de estos estudios, se identificaron genes marcadores de resistencia a fungicidas (benzimidazol (*Mbc1*) y dicarboximida (*Daf1*)) que estaban muy cerca uno del otro, y ambos más distantes de otro gen (*Mat1*) (Faretra y Pollastro, 1991; Beever y Parkes, 1993). Se han identificado también dos genes (*Dic1* y *Dic2*) que confieren resistencia al fungicida dichlofluanid (Pollastro *et al.*, 1996) que han sido utilizados para confirmar el establecimiento de cruzamientos en laboratorio y que han mostrado un gran valor para construir un mapa de ligamiento genético para el hongo *B. cinerea*. El estudio de los datos de segregación en estos cruzamientos demuestran que, efectivamente, la reproducción sexual tiene lugar en *B. cinerea* y que con datos lo suficientemente numerosos y con la inclusión de suficientes marcadores genéticos es posible construir mapas genéticos que

encuentran numerosas y, ciertamente, muy útiles, aplicaciones. Así, recientemente se ha generado un mapa genético en esta especie basado en la segregación de 134 marcadores de tipo microsatélite y 62 SNPs en una población segregante de 68 individuos que ha sido de gran utilidad para verificar y confirmar el ensamblaje de la información derivada del proyecto de la secuenciación del genoma de la cepa T4 de *B. cinerea* (Amselem *et al.*, 2011).

1.5.3 – ELEMENTOS EXTRACROMOSOMALES

Los hongos en general, y *B. cinerea* en particular, poseen distintos tipos de elementos genéticos extracromosomales, como los cromosomas de la mitocondria, algunos virus, plásmidos y transposones (Rosewich and Kistler, 2000). Mientras las mitocondrias y los cromosomas mitocondriales son esenciales para la supervivencia del organismo, los otros elementos indicados son generalmente dispensables. Además de ser portadores de genes implicados en su propio mantenimiento, estos elementos pueden influir en la fisiología del huésped, por lo que resulta particularmente interesante conocer su biología y sus mecanismos de transmisión y herencia. Consideramos a continuación los elementos de este tipo más importantes en *B. cinerea*.

1.5.3.1 – MITOCONDRIA Y PLASMIDIOS MITOCONDRIALES

El ADN mitocondrial ofrece una fuente de variación genética particular y distinta de la nuclear y muy útil en el estudio de la variación intraespecífica en hongos (Typas *et al.*, 1998). En las mitocondrias de *B. cinerea* encontramos tanto un genoma circular de unas 25,8 Kb (Vallejo *et al.*, 1996) como plásmidos lineales de 2-3 Kb (Hiratsuka *et al.*, 1987). Hasta el momento no se ha podido determinar que la presencia de alguno de estos plásmidos confiera ventaja selectiva alguna al hongo. Quizás alguno de ellos esté relacionado con los procesos de senescencia inducida por la mitocondria (Griffiths, 1995). Es interesante destacar que se ha podido comprobar la transferencia de genes presentes en estas estructuras tanto por contacto citoplasmático como por transferencia directa horizontal (Rosewich and Kistler, 2000).

1.5.3.2 – ELEMENTOS TRANSPONIBLES

Los transposones son elementos genéticos ubicuos descritos en todos los procariontes y eucariotes investigados. Fueron descubiertos inicialmente en el maíz, en los años 40 por Barbara McClintock (McClintock, 1947; McClintock, 1951). En hongos, fueron primeramente identificados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (revisado en Boeke, 1989), y más

recientemente en hongos filamentosos (Oliver, 1992; Dobinson and Hamer, 1993; Daboussi, 1997). En contraste con los genes (los elementos genéticos convencionales), los transposones son capaces de moverse a nuevos sitios dentro del genoma huésped y su actividad tiene un gran impacto sobre la expresión génica y la evolución del genoma. Según Callinan and Batzer (2006), casi el 50% del genoma humano es el resultado de la actividad y duplicación de transposones a lo largo de su historia evolutiva y aproximadamente el 0.27% de las enfermedades humanas son atribuidas a los retro-transposones como consecuencia de mutaciones derivadas de la actividad de aquéllos mediante diferentes tipos de mecanismos, tales como la mutagénesis insercional, la recombinación ilegítima o la reorganización cromosómica (revisado por Callinan and Batzer, 2006).

Distintas consideraciones evolutivas permiten contemplar a los transposones como parásitos genéticos (Doolittle and Sapienza, 1980). No obstante, observaciones recientes sugieren la ocurrencia de procesos de coadaptación entre el huésped y el parásito que permiten atenuar el daño o los efectos derivados de la presencia del elemento transponible en el genoma del huésped (Kidwell and Lisch, 1997). Algunos estudios sugieren incluso que los transposones pueden ser beneficiosos para los huéspedes (Moore and Haber, 1996; Teng *et al.*, (1996) y Biessmann *et al.*, (1992)). Trabajos recientes indican que la actividad de los transposones está frecuentemente regulada a través de mecanismos epigenéticos en el huésped y que los cambios ambientales pueden determinar cambios fisiológicos y, como consecuencia de los mismos, estrés epigenético en el huésped que puede alterar este fino control que mantienen los sistemas vivos sobre la actividad de los transposones (revisado por Slotkin and Martienssen, 2007; Rebollo *et al.*, 2010). La reactivación de la movilización de estos elementos puede proporcionar al huésped nuevas rutas de escape genético ante estas situaciones de estrés. Algunos autores sugieren que la macroevolución y la especiación pudieran producirse cuando el huésped relaja, por una u otra razón, su control epigenético sobre la actividad de los transposones (Rebollo *et al.*, 2010).

Los elementos transponibles eucarióticos son clasificados en dos clases, siguiendo un criterio de clasificación basado en la naturaleza de su mecanismo de transposición: Los elementos incluidos en la Clase I (retrotransposones) se transponen a través de un ARN intermediario y utilizan enzimas del tipo transcriptasa reversa en un sistema conocido como "copia y pega". Los elementos de la Clase II (transposones de ADN) se transponen directamente ellos mismos en forma de ADN a un nuevo sitio del genoma mediante un sistema de "corta y pega". Cada grupo de estos dos grupos de transposones incluye elementos autónomos y elementos no autónomos. Los primeros presentan fases abiertas de lectura que codifican los productos génicos necesarios para la transposición. Por el contrario, los segundos, los elementos no autónomos, no codifican estas proteínas pero pueden mobilizarse utilizando las codificadas por elementos autónomos y porque retienen secuencias "cis" necesarias para la transposición (revisado por Rebollo *et al.*, 2010).

Los transposones de Clase I pueden ser de dos tipos, autónomos (LTR y LINE) y no autónomos (SINE) (Rebollo *et al.*, 2010). Los retrotransposones de tipo LTR presentan repeticiones largas directas en sus extremos. Los elementos autónomos de este grupo contienen al menos dos genes, llamados *gag* y *pol*. El gen *gag* codifica una proteína similar a la proteína de la cápsida y el gen *pol* codifica una multiproteína con actividad proteasa, transcriptasa inversa, RNase H e integrasa. Los retrotransposones de tipo no LTR, se dividen en los elementos denominados "elementos autónomos largos dispersos" (LINEs) y en los elementos denominados "elementos no autónomos cortos dispersos" (SINEs).

Los transposones de Clase II se caracterizan por presentar repeticiones cortas invertidas (IR) en sus extremos y contienen un gen que codifica para una transposasa que dirige el reconocimiento de los extremos del fragmento de ADN que constituye el transposón y su transposición a otra posición del genoma.

Elementos transponibles de una y otra clase han sido descritos en hongos filamentosos. En los últimos años el estudio de los elementos transponibles en los hongos filamentosos ha atraído un considerable interés por varias razones: (1) los hongos tienen genomas de tamaños relativamente pequeños (del orden de 30-40 Mb) y los cromosomas pueden ser separados fácilmente mediante electroforesis de campo pulsado: ello permite abordar el estudio de su organización y de la distribución de transposones en el genoma del huésped y de su relación con la evolución del propio genoma del huésped de una manera asequible; (2) muchos hongos han desarrollado mecanismos para inactivar secuencias repetidas (RIP en *N. crassa* y MIP en *A. immersus*), y el estudio del comportamiento de los transposones y su silenciamiento constituyen un material excelente para diseccionar estos procesos de inactivación; (3) los hongos son organismos cenocíticos, que contienen un gran número de núcleos en un único compartimento citoplasmático. La actividad de los transposones puede determinar la acumulación de muy distintas mutaciones que coexisten en un fondo genético común; (4) la regulación de la transposición es una cuestión que todavía no se conoce ni comprende en detalle. El descubrimiento de que el transposon *Restless* sufre procesamiento alternativo de su mRNA puede ayudar a profundizar en el conocimiento de la regulación de la transposición; (5) los mecanismos de transposición, en particular los de los elementos de la Clase II, todavía no se conocen en todos sus detalles. La disponibilidad de mutantes deficientes en mitosis y en meiosis en especies de los géneros *Aspergillus* y *Neurospora* pueden ayudar a esclarecer estos mecanismos; y (6) el estudio de la transferencia horizontal de genes puede ser llevado a cabo en organismos como *Fusarium*, sistema en el que el análisis del transposon *Fot1* demuestra que la transferencia horizontal puede estar operando y ser relevante en las especies del género.

Una visión general de los resultados obtenidos en los trabajos realizados sobre transposones en hongos permite destacar algunas consideraciones interesantes. Así, (1) se trata de elementos integrantes del genoma de los hongos que son muy antiguos, pues su presencia es generalizada en los principales grupos de hongos, tanto en Ascomycetos, como

en Zygomycetos y en Basidiomicetos; (2) todos los tipos de transposones descritos en eucariotas están presentes en los hongos; (3) algunas de las especies de hongos filamentosos, como las especies patógenas de planta como *M. grisea* y *F. oxysporum*, son particularmente ricas en esos elementos; y (4) los elementos transponibles han sido identificados mayoritariamente en cepas no domesticadas, que casi nunca presentan meiosis.

Hasta el momento se han descrito dos transposones en *B. cinerea*: *Boty*, que pertenece al grupo *tipo-gypsy* de la Clase I (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper*, que es un transposón de Clase II, que pertenece al grupo *Fot1* (Levis *et al.*, 1997). *Boty* es efectivamente un retrotransposón de Clase I con un tamaño de 6 kb, caracterizado por presentar repeticiones terminales largas (LTR) y presente en múltiples copias en distintas regiones del genoma (Diolez *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1999). *Flipper* es un elemento de la Clase II. Su secuencia tiene 1842 pares de base y presenta repeticiones terminales invertidas (TIRs) de 48 bp y una fase abierta de lectura (ORF) que codifica una proteína de 533 aminoácidos, una transposasa. La proteína codificada es muy similar a las transposasas de otros hongos fitopatógenos, como *Fot1* de *F. oxysporum* y *Pot2* y *MGR586* de *M. grisea*. El número de copias del elemento *Flipper* puede variar de 0 a 20 copias por genoma en cepas de *B. cinerea* (Levis *et al.*, 1997).

Los estudios llevados a cabo en distintos aislados y poblaciones de aislados de *B. cinerea* sobre estos transposones han proporcionado informaciones muy interesantes. En los trabajos de Giraud *et al.*, (1997 y 1999) se describe que la presencia/ausencia de los elementos transponibles *Boty* y *Flipper* en *B. cinerea* permiten establecer dos especies simpátricas en este hongo, *Transposa* y *Vacuma*. Los aislados incluidos en el grupo *Transposa* son aislados de *B. cinerea* que contienen los elementos *Boty* y *Flipper*, o solamente *Boty*, o solamente *Flipper*. Las cepas que no presentan ninguno de los elementos transponibles definen el grupo denominado *Vacuma*. Se propone que constituyen dos especies simpátricas con diferencias significativas en cuanto a su rango de huéspedes y a sus características de patogenicidad. Este hecho contradice la idea tradicional de que *B. cinerea* es una población clonal sin especialización (Giraud *et al.*, 1999).

El análisis del genoma de dos aislados de la especie *B. cinerea* y su comparación con el genoma de un aislado de la especie *S. sclerotiorum* (Amselem *et al.*, 2011) ha permitido demostrar que los transposones son muy abundantes en ambas especies, en particular en *S. sclerotiorum*, detectándose elementos que han sido anotados como pertenecientes a la Clase I (de tipo LTR y LINE), a la Clase II (MITE o TIR) y en algunos casos como de tipo desconocido. En su conjunto los transposones suponen un 7% del genoma de *S. sclerotiorum* y un 0.6% y un 0.9% del genoma de las cepas T4 y B05.10 de *B. cinerea*, respectivamente. *S. sclerotiorum* tiene, por lo tanto, un contenido en transposones aproximadamente 10 veces superior a *B. cinerea*, aumento que aparece asociado tanto a un incremento en el número de familias de transposones como a un incremento en el número total de copias de cada transposón. Los análisis llevados a cabo indican que el genoma de *S. sclerotiorum* ha experimentado

recientemente una profunda remodelación que aparece asociada a una muy importante expansión de elementos transponibles (Amselem *et al.*, 2011).

1.5.3.3 – MICOVIRUS

Los micovirus, o virus de hongos, son muy comunes en este grupo de organismos, pudiendo su genoma estar encapsulado en el interior de una cubierta proteica o no. A diferencia de lo que sucede en virus de otros grupos de especies, los micovirus generalmente no causan "infección" con síntomas evidentes en el huésped. Se transmiten fácilmente a las esporas asexuales durante el ciclo de vida asexual, pero la transmisión a la descendencia sexual es muy ineficiente, si es que existe en alguna medida (Coenen *et al.*, 1997; Chun and Lee, 1997). La mayor parte de los micovirus tienen un genoma constituido por ARN de doble cadena (ARNds) y precisamente este tipo de elementos son muy comunes en *B. cinerea*. Los estudios llevados a cabo por Howitt *et al.*, (1995), demuestran que las infecciones por este tipo de virus en *B. cinerea* son muy frecuentes (más del 70% de los aislados de campo analizados estaban infectados por virus ARNds) y que los perfiles observados en las distintas cepas, en términos de número de bandas y de tamaño de las mismas, son muy diversos, reflejando probablemente la ocurrencia de infecciones mixtas o la existencia de virus satélites o de ARNds defectivos. En algunos casos se han obtenido evidencias que indican que tales virus ARNds se acumulan en el citoplasma y que su presencia está relacionada con procesos de degeneración celular (Vilches and Castillo, 1997; Castro *et al.*, 1999). Aparte de estos trabajos, ningún estudio ha permitido establecer un efecto fenotípico evidente derivado de la presencia de estos virus en el hongo.

Además de los virus ARNds que acabamos de indicar también se han descrito dos virus ARN de cadena sencilla (ARNss) en *B. cinerea* que han sido caracterizados y secuenciados completamente (Howitt, 1998; Howitt *et al.*, 2001). El análisis detallado de sus secuencias resulta informativo y sugiere la posibilidad de que se haya producido alguna forma de transferencia horizontal de genes entre plantas (concretamente del género *Allium*) y *B. cinerea*.

Es interesante insistir en el hecho de que hasta el momento no se ha detectado un fenotipo directo y obvio en el huésped derivado de la infección por micovirus en *B. cinerea*, en particular por virus ARNds. No obstante cabe destacar las observaciones realizadas por Castro *et al.*, (2003) que describen un fenómeno de hipovirulencia en *B. cinerea* relacionada con la presencia de un virus ARNds similar al descrito en otros hongos fitopatógenos (Dawe and Nuss, 2001) y que ha despertado en algunos sistemas el interés por su caracterización detallada para su posible utilización como agente de biocontrol.

1.5.4 – COMPATIBILIDAD SOMÁTICA Y HETEROCARIOSIS

La compatibilidad somática es la capacidad que presentan determinadas cepas de numerosas especies de hongos para fusionar sus hifas durante el desarrollo vegetativo dando lugar a heterocariontes, entidades biológicas en las que coexisten núcleos de tipos diferentes. La caracterización de los grupos de compatibilidad somática entre individuos de poblaciones de una determinada especie ha sido, y es en la actualidad, una técnica utilizada para caracterizar y subdividir especies de hongos en grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs – "vegetative compatibility groups"). La existencia de estos VCGs ha sido demostrada generalmente haciendo uso de ensayos con mutantes auxotróficos derivados de cepas silvestres de interés que han sufrido mutaciones que alteran determinadas rutas metabólicas, por ejemplo de biosíntesis de aminoácidos, de bases nitrogenadas o de vitaminas). En la mayor parte de los casos, también en *B. cinerea*, los mutantes más utilizados en este tipo de estudios son los mutantes resistentes a clorato e incapaces de utilizar nitrato (Nit) como fuente de nitrógeno, ya que aparecen con elevada frecuencia de forma espontánea. Se pueden clasificar fácilmente en función de sus requerimientos nutricionales y es posible evaluar la ocurrencia de la fusión de hifas mediante test de complementación en medios mínimos. En particular los mutantes más fiables son los deficientes en la apoenzima nitrato reductasa (*nit1*) y los deficientes en la síntesis del cofactor que contiene molibdeno necesario para la actividad del enzima nitrato reductasa y la actividad del enzima xantina deshidrogenasa (Nit M).

En *B. cinerea* se ha demostrado la existencia de grupos de compatibilidad vegetativa y que éstos son muy numerosos (Beever and Parkes, 2003). La base de la incompatibilidad vegetativa aún no ha sido determinada en *B. cinerea*, pero las evidencias acumuladas sugieren que el sistema se ajusta al identificado en otros hongos ascomicetes, en los que la incompatibilidad está determinada por una serie de genes de incompatibilidad vegetativa (*vic* o *het*) cada uno de los cuales puede manifestarse en dos (ocasionalmente más) formas alélicas. Las cepas que tienen la misma combinación de alelos en todos los genes de incompatibilidad son compatibles y pueden fusionar sus hifas. Las cepas que difieren en uno o más *loci* son incompatibles. El gran número de grupos de compatibilidad descritos en *B. cinerea*, junto con el reducido número de cepas que se identifican como integrantes de cada uno de ellos, son consideradas como evidencias de que la reproducción sexual juega un papel importante en las poblaciones naturales del patógeno como mecanismo generador de variabilidad genética.

La compatibilidad vegetativa puede determinar ciertamente la formación de heterocariontes en *B. cinerea*. Como hemos visto, la formación de heterocariontes en el laboratorio ha sido descrita por distintos grupos de investigación. Sin embargo, aunque parece lógico pensar que deben producirse en la naturaleza, las evidencias directas sobre su existencia o formación en las poblaciones naturales son limitadas. Cabe destacar algunas observaciones de interés en este contexto que apuntan en este sentido. Así, Hansen (1938) identificó aislados monospóricos de diferentes tipos morfológicos (M – micelial; C – conidial y

un tipo intermediario M/C) originados a partir de un mismo parental. Los tipos M y C (homotipos) sólo generan descendientes de tipo M o C, respectivamente, y los tipos M/C (heterotipos) pueden generar de nuevo los tres tipos morfológicos entre su descendencia vía esporas asexuales. Ese autor concluyó que los morfotipos M/C son heterocariontes, siendo una mezcla entre núcleos M y núcleos C, y que los aislados de campo analizados se presentaban mayoritariamente como heterocariontes. En esta misma línea de evidencias, podemos destacar, entre otros, los estudios de Summers *et al.*, (1984) trabajando en resistencia a fungicidas que demostraron que un aislado de campo resistente a dicarboximida era heterocarionte y que a partir del mismo era posible obtener aislados monospóricos derivados homocariontes, bien resistentes, bien sensibles, al fungicida.

Por lo tanto, es posible afirmar que la heterocariosis en *B. cinerea* se produce también en la naturaleza. La cuestión más importante a la que debemos tratar de dar respuesta es hasta qué punto la heterocariosis contribuye a generar variabilidad con relevancia biológica en las poblaciones naturales del patógeno.

1.6 – MÉTODOS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

El control del hongo *B. cinerea* es difícil debido a la gran variedad de modos de ataque de los que puede hacer uso, al gran número de huéspedes que puede infectar, y que en cada caso constituyen nuevas fuentes de inóculo, a su capacidad para sobrevivir y dispersarse eficientemente en forma de micelio y de conidio y a su capacidad de sobrevivir como esclerocio durante periodos de tiempo prolongados y en condiciones climáticas adversas. Por esas razones, es probable que el uso de medidas de control consideradas y aplicadas de forma individual no resulte eficiente. Para desarrollar estrategias de control efectivas es muy importante entender las interacciones planta-patógeno en las que participa cada patógeno, conocer el medio ambiente en el que el hongo se desarrolla y también conocer los posibles microorganismos competidores (Williamson *et al.*, 2007). La moderna fitopatología está llevando en consideración, además, la necesidad de conocer la estructura genética de las poblaciones de los patógenos para comprender mejor las estrategias de control de los hongos de una manera general (Bruns *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1993; Milgroom 1996).

En relación al hongo *B. cinerea*, se cree que una de las principales razones de las dificultades encontradas en el manejo de la enfermedad es el escaso entendimiento de la estructura genética de las poblaciones naturales del patógeno. La complejidad y variabilidad de este hongo en la naturaleza hace difícil su control. En principio no puede descartarse la existencia de diversas poblaciones del patógeno, poblaciones integradas por individuos de características genéticas y fisiológicas distintas. En efecto, si hubiera distintas poblaciones del patógeno, adaptadas cada una a un huésped distinto, genéticamente aisladas y con diferente potencial patogénico y diferente nivel de resistencia a fungicidas, resultaría absolutamente

esencial analizar y caracterizar la estructura poblacional del patógeno para aspirar a diseñar estrategias de control efectivas. A pesar de la importancia de *B. cinerea* como hongo fitopatógeno y de la disponibilidad de diversas técnicas de genética molecular para caracterizar la diversidad genética de microorganismos, hasta fechas recientes los estudios realizados sobre la estructura de las poblaciones de *B. cinerea* han sido escasos (Muñoz *et al.*, 2002). Afortunadamente la situación está cambiando en los últimos años y, como veremos más adelante, en la actualidad se está generando información muy relevante sobre la estructura y dinámica de las poblaciones naturales de *B. cinerea*.

El control de la podredumbre gris involucra la aplicación, muchas veces simultáneamente, de métodos químicos (Latorre *et al.*, 1994) y biológicos (Harman *et al.*, 1996), así como también de programas basados en el control de las condiciones climáticas (Broome *et al.*, 1995). Desafortunadamente, todos estos métodos han demostrado en muchos casos un éxito limitado en el control de la enfermedad, como por ejemplo en el control en epidemias severas que ocurren anualmente en el Valle Central en Chile (Muñoz *et al.*, 2002).

De manera muy general podemos decir que las estrategias comúnmente utilizadas en el control de la podredumbre gris se pueden agrupar en cinco categorías: control químico, control biológico, prácticas y métodos culturales, métodos de estimulación de las respuestas de defensa de la planta y la mejora genética de la resistencia a la enfermedad.

1.6.1 - CONTROL QUÍMICO

Los métodos de control más comunes de *B. cinerea*, en particular sobre la vid, son en primer lugar el manejo adecuado de la planta y de su aparato vegetativo en las distintas fases del cultivo y en segundo lugar el uso profiláctico de fungicidas (Jacometti *et al.*, 2010).

Los fungicidas sintéticos pueden afectar al patógeno alterando distintos aspectos de su desarrollo. Estos fungicidas sintéticos pueden incluirse y clasificarse en hasta diez grupos químicos distintos y se agrupan en dos clases principales: los sistémicos y los de contacto. El primero es absorbido por la planta y transportado a través de ella y no hay necesidad de tener contacto directo con el hongo. El segundo, necesita contacto directo con el patógeno para ejercer su efecto.

La mayor parte de los grupos de fungicidas tienen una utilización muy restringida o no pueden utilizarse en absoluto en la industria de la uva y del vino debido a la frecuente aparición de resistencias en el hongo hacia esos productos (Pappas, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Leroux 2004), a las preocupaciones de la opinión pública sobre posible efectos de los químicos sintéticos sobre la salud humana (Becker and Schwinn 1993; Fokkema 1993; Johnson 1994; Elmer and Michailides 2004; Farquhar *et al.*, 2009) y a los problemas de polución ambiental que pueden derivarse de su utilización (Howell, 2001; Elmer and Michailides, 2004).

Uno de los últimos fungicidas antibotrytis desarrollados es la hydroxianilida fenhexamida, principio especialmente activo contra hongos fitopatógenos del orden Leotiomyces. Este principio activo inhibe el enzima 3-ketoreductasa del complejo enzimático responsable de la C-4-demetilación durante la biosíntesis del ergosterol (Fillinger *et al.*, 2008). La ruta biosintética del ergosterol es un blanco para muchos antifúngicos en el sector médico y agrícola. Los principales antifúngicos usados en la medicina y en la agricultura son inhibidores de 14-demetilación (DMIs), representados por derivados de triazoles como epoxiconazol, tebuconazol o fluconazol (Akins, 2005; Koller, 1992). Entre los inhibidores de C-4-demetilación, el único fungicida usado en la agricultura es la fenhexamida, que es activo contra *B. cinerea* y especies relacionadas (*Sclerotinia* spp. y *Monilinia* spp.) (Rosslbroich, 1999).

Los productos más utilizados en la "viticultura orgánica", tratando de evitar la aplicación de fungicidas, han sido dos productos que contienen cobre en su composición: "el caldo Bordeles" (una mezcla de sulfato de cobre y cal hidratada) y sulfato de cobre (Jackson 2008a). No obstante, la mayoría de los viticultores tratan de evitar la utilización de cobre (Darriet *et al.*, 2001), debido a que este componente puede reducir la concentración de algunos aromas varietales importantes en el vino, alterar su sabor y aumentar la acumulación de ácido sulfídrico, que puede causar olores no deseados en el vino (Darriet *et al.*, 2001; Jackson, 2008a). El cobre puede ser, además, fitotóxico (Rathore and Khan, 2000) y se puede acumular en los suelos agrícolas (Rathore and Khan, 2000; Jackson, 2008b), lo que puede determinar la aparición de clorosis en las hojas (Jackson, 2008b) y la disminución de la actividad biológica en los suelos (Parat *et al.*, 2002). Por otra parte, *B. cinerea* puede desarrollar resistencia al cobre en condiciones de laboratorio (Parry and Wood, 1958), pero hasta ahora esta resistencia no ha sido observada en campo. No obstante, los problemas de tipo medioambiental mencionados anteriormente, así como su efecto sobre la calidad de los vinos, han creado un movimiento activo contra el uso de fungicidas basados en cobre en la viticultura (Jackson, 2008a).

1.6.2 - CONTROL BIOLÓGICO

Una alternativa para el uso del control químico es el uso del control biológico con agentes antagonistas tales como especies de *Trichoderma*, *Bacillus*, *Ulocladium* y *Streptomyces* (Jacometti *et al.*, 2010).

Existen tres tipos principales de control biológico, denominados "clásico", "inundativo" y "conservativo", respectivamente. Según Eilenberg *et al.*, (2001), el control clásico es "la introducción intencional de un agente de control biológico exótico, generalmente co-evolucionado con el patógeno, para su establecimiento permanente y para un prolongado control del parásito". Debido a la amplia distribución del patógeno, su alta tasa de crecimiento y los bajos niveles de parasitismo observados en esta especie, no se ha trabajado muy

intensamente en la utilización de agentes de control biológico (BCA -Biological Control Agents- en la terminología inglesa) contra *B. cinerea* (Elad y Stewart, 2004).

El control biológico inundativo, según Eilenberg *et al.*, (2001), es definido como “el uso de organismos vivos para controlar patógenos cuando el control es logrado exclusivamente por los propios organismos liberados”. Este es el método de control biológico dominante en el caso de *B. cinerea* (Elmer and Michailides, 2004; Williamson *et al.*, 2007). Generalmente implica la liberación en masa de BCA y puede ser efectivo suprimiendo *B. cinerea* en vid (en las uvas) (Schilder *et al.*, 2002) y en otros cultivos (Ingram and Meister, 2006). Esos organismos pueden operar a través de un único mecanismo, o de una combinación de mecanismos, tanto directamente, como consecuencia de su parasitismo (Wisniewski *et al.*, 1991; Elad, 1995; Howell, 2003) o de su adhesión directa a la superficie de *B. cinerea* (Wisniewski *et al.*, 1991; Elad, 1996) o indirectamente, como consecuencia de mecanismos de competición (Blakeman, 1993; Elad *et al.*, 1994; Elad, 1996), de la inducción de resistencia en la planta (Korolev *et al.*, 2008), de la producción de compuestos inhibidores (Nelson and Powelson, 1988; Edwards and Seddon, 1992) o de la alteración de las propiedades físicas del ambiente local (Edwards and Seddon, 1992).

El uso del control biológico conservativo aún no ha sido descrito en vid. Eilenberg *et al.*, (2001) lo definen como “la modificación del medio o prácticas existentes para proteger o aumentar los enemigos naturales específicos u otros organismos para reducir el efecto de los patógenos”.

Los agentes de control biológico contra *B. cinerea* son normalmente hongos filamentosos del genero *Trichoderma*, *Ulocladium* y *Gliocladium*, bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y levaduras de los géneros *Pichia* y *Candida* (Elmer and Michailides, 2004).

Los biofungicidas son tratamientos predominantemente preventivos y no son efectivos en la pos-infección, por eso necesitan ser aplicados cuando las condiciones climáticas son ideales para la colonización por los BCA y antes de periodos en los que que la vid está vulnerable, como la floración, la brotación/caída de las hojas y después del cambio de color de la uva (Whipps and Lumsden, 2001).

También es posible combatir *B. cinerea* mediante la utilización de aceites esenciales, que son extraídos de plantas y que contienen aromas volátiles bioactivos que pueden ser efectivos contra ese hongo, pero las concentraciones requeridas para ser efectivas son frecuentemente tóxicas para las plantas (Walter *et al.*, 2001; Plotto *et al.*, 2003), pueden dejar residuos en las hojas (Elmer and Reglinski, 2006) y, por último, también pueden alterar el sabor y olor de las uvas y vino (Redl and Bauer, 1990). Pero mientras el tema de la seguridad, fitotoxicidad y alteración del sabor y olor del vino son resueltos, estos productos no constituyen una alternativa efectiva a los convencionales botryticidas (Jacometti *et al.*, 2010).

Otra forma de suprimir *B. cinerea* es la aplicación de aceite mineral (blanco o parafina) (Dell *et al.*, 1998). Debido a sus propiedades de extensión y adhesión, ese aceite es considerado efectivo en bajas dosis. Si se aplica en altas concentraciones puede tener efecto fitotóxico en las plantas, especialmente si el aceite no está bien refinado.

1.6.3 - PRÁCTICAS CULTURALES Y MANEJO DEL HÁBITAT LOCAL

La manipulación del hábitat, también llamado como control biológico reconstituyente (Everett *et al.*, 2005), comparte técnicas con la conservación biológica pero las asignaturas no son sinónimas (Gurr *et al.*, 2000). Mientras el control biológico intenta reducir la población de las especies a través de la exposición a predadores naturales, parasitoides y competidores, la manipulación del hábitat trata de regular la plaga a través de la limitación de los recursos disponibles, como comida y refugio (Gurr *et al.*, 2000).

A la hora de considerar el manejo de las técnicas de cultivo con el objeto de reducir la incidencia de *B. cinerea* en la vid, existen dos tipos de tácticas o estrategias de combate: una directa, a través de la modificación de la superficie de la cepa (planta), por ejemplo, mediante la poda y corte de las hojas, y uno indirecto, mediante la alteración del vigor de la cepa o el control del ambiente local, por ejemplo, manejando adecuadamente la cubierta vegetal (Jacometti *et al.*, 2010).

El manejo directo ayuda a disminuir los efectos de la podredumbre gris cuando existen condiciones ambientales como alta humedad, baja luminosidad y temperaturas moderadas, condiciones que promueven la formación de conidios y también facilitan la germinación y penetración en el huésped. Con la reducción de la cubierta vegetal, aumenta la aireación y así se minimizan los parámetros de las condiciones que favorecen el desarrollo de *B. cinerea*. En el manejo indirecto, el uso de túneles de plástico o coberturas protectoras de la lluvia permite reducir los efectos de la enfermedad durante el período de floración de cultivos de frutos blandos, como la fresa o frambuesa (Xiao *et al.*, 2001). Otros ejemplos de manejo indirecto son el uso de la ventilación, que ayuda a reducir la humedad relativa en cultivos bajo cubierta. También la utilización de cubiertas plásticas con filtros UV, modifican el espectro de la luz solar y de esta manera reduce la formación de conidios y la infección en varios cultivos (Reuveni and Raviv, 1992; Reuveni *et al.*, 1989; West *et al.*, 2000). Evitar la formación de rocío sobre las hojas del cultivo en invernaderos fríos antes del amanecer, con un calentamiento rápido del aire, puede controlar el surgimiento de la infección (Dik and Wubben, 2004).

B. cinerea también ataca en la post-cosecha y una manera de controlar su aparición es la utilización de la cadena de frío continuada en frutos no madurados y que no hayan sufrido muchos daños. Si el frío se ve alterado en algún punto de la cadena, el hongo puede reactivarse y afectar a todo el cargamento.

La predicción de la enfermedad en combinación con datos meteorológicos precisos, ha resultado muy eficaz en la reducción de los daños producidos por el hongo (Berrie *et al.*, 2000; Broome *et al.*, 1995). Además, el uso de prácticas de control integrado, como el uso de distintos agentes químicos para evitar la aparición de resistencias, el esfuerzo de aplicar en menor medida los pesticidas para mantener al mínimo el nivel de residuos, la utilización de agentes biológicos de control apropiados al régimen de temperatura y humedad, la eliminación escrupulosa de restos vegetales del cultivo para eliminar posibles focos de infección futuro, el espaciado del cultivo o podas adecuadas y constantes para asegurarse una buena ventilación pueden prevenir de una manera asombrosa el ataque de *B. cinerea* y reducir de una manera considerable las pérdidas por podredumbre gris.

1.6.4 – ESTIMULACIÓN DE LAS DEFENSAS DE LA PLANTA

Diversos componentes bióticos y abióticos pueden provocar o estimular la respuesta defensiva de la planta, constituyendo esta activación un mecanismo altamente efectivo en el combate a *B. cinerea* en uvas. Esos compuestos pueden ser hormonas de plantas, estimulantes abióticos, extractos de plantas y microorganismos, y microbios (Elmer and Reglinski, 2006).

Entre las hormonas de plantas destacan el ácido salicílico y el ácido β -amino butírico, que pueden suprimir efectivamente *B. cinerea* en uvas (Reglinski *et al.*, 1997). El ácido jasmónico induce la producción de estilbeno en uva, que ayuda a suprimir la infección de *B. cinerea* (Baarlen *et al.*, 2004).

Los estimulantes abióticos para los cuales se ha demostrado un papel inductor de una respuesta de resistencia sistémica en vid son fertilizantes que contienen nitrógeno (revisado por Mundy, 2008). Formas solubles de silicio, que también contribuyen a proporcionar fortaleza a las paredes celulares, mejoran la resistencia al mildiu y también a *B. cinerea* (Miceli *et al.*, 1999; Jacometti *et al.*, 2007). El cobre puede suprimir también *B. cinerea* elicitando la acumulación de peroxidasas, fenoles, resveratrol y antocianinas (Coulomb *et al.*, 1998).

Los extractos de plantas de especies tales como *Adenocalyma alleaceum*, *Aglaiia odorata*, *Allium ampeloprasum*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium ramosum*, *Allium sativum*, entre otras, son potentes estimulantes de la defensa de las plantas (revisado por Jacometti *et al.*, 2010). Estos extractos tienen la habilidad de suprimir múltiples patógenos (Schilder *et al.*, 2002), son compatibles con otros productos, incluyendo fungicidas sintéticos (Jeandet *et al.*, 1996, Jeandet *et al.*, 2000) y biofungicidas (Bardin *et al.*, 2004, Bardin *et al.*, 2008) y tienen niveles de supresión de patógenos comparables a los fungicidas convencionales (Schmitt *et al.*, 2002). Por todas estas razones, este tipo de productos forman parte de los sistemas de manejo integrado de plagas.

También se ha demostrado que los extractos de abono orgánico (extracto de estiércol de caballo y ganado) pueden controlar varios patógenos de plantas, incluyendo *B. cinerea*. Por ejemplo, se ha comprobado que un extracto hecho de restos de uva y de estiércol de caballo y ganado bovino pueden suprimir *B. cinerea* en las hojas cortadas en vid hasta en un 95% (Elad y Shtienberg, 1994). Los mecanismos mediante los cuales se produce este control no son ni mucho menos conocidos. En la actualidad se está trabajando sobre su naturaleza y aplicación y se considera que son métodos que se pueden considerar complementarios a los actualmente utilizados.

Los microorganismos inducen la respuesta de defensa de la planta cuando entran en contacto con ella (Elad, 2000; Yedidia *et al.*, 2003). Esta activación puede ser causada por microorganismos no patógenos, fenómeno conocido como resistencia inducida sistémica (ISR), o por microorganismos patógenos, que es un fenómeno conocido como resistencia adquirida sistémica (SAR) (van Loon, 2007). Manonmani *et al.*, (2007) han presentado una excelente revisión sobre la utilización de la ISR y de la SAR desde el punto de vista de utilización en el control de enfermedades.

1.6.5 – MEJORA GENÉTICA

Como hemos discutido anteriormente, *B. cinerea* presenta una gran diversidad genética y también una gran diversidad de mecanismos de infección, lo que hace difícil encontrar genes de resistencia en especies vegetales contra este patógeno. Algunas características de las plantas, tales como algunas propiedades morfológicas (grosor de la cutícula o la vellosoidad de la epidermis) o diferencias en el crecimiento (época de maduración de los frutos o la densidad de frutos en el racimo o de hojas), promueven naturalmente la resistencia de la planta frente al ataque del patógeno. Debido a que estas características de las especies vegetales son gobernadas generalmente por un número variable de genes, la consideración de la transferencia de los genes implicados en su determinación a los cultivares de interés es un problema complicado. No obstante, se ha obtenido resultados parciales en algunos casos, como en especies silvestres del género *Solanum* relacionadas con el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*), en las que se ha identificado cierto nivel de resistencia en hojas y tallos a *B. cinerea* (Guimarães *et al.*, 2004; ten Have *et al.*, 2007). Así, ha sido posible identificar varios QTLs para resistencia frente a *B. cinerea* en la especie *Solanum habrochaites* (Finkers *et al.*, 2007a; Finkers *et al.*, 2007b), lo que hace aumentar las perspectivas de control de este patógeno en especies de tomate. El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a *B. cinerea* en estas especies permitiría considerar el desarrollo y utilización de técnicas de transferencia genética para mejorar y aumentar la respuesta defensiva de los huéspedes frente al ataque del patógeno sin afectar otras características del cultivo importantes para el agricultor y el consumidor.

A pesar de todos los avances en el campo molecular, todavía no se ha encontrado ningún fungicida que actúe a nivel molecular con efectos notables. La diversidad de factores de virulencia que intervienen en el proceso infectivo de *B. cinerea* hacen que no haya una solución única al problema. Además, la controversia de los cultivos transgénicos en Europa presenta un problema social y económico importante, ralentizando la experimentación con plantas transgénicas y su aplicación en la agricultura.

2 - LA VID

2.1 – ORIGEN Y SISTEMÁTICA

La vid constituye en la actualidad uno de los principales cultivos hortícolas en todo el mundo. Es una especie asociada a la agricultura desde los inicios de ésta, una actividad que ha sido fundamental para el desarrollo de las sociedades humanas y de sus culturas. El principal producto derivado de la vid, el vino, ha jugado y juega en la actualidad un papel particularmente destacado en la tradición y en la cultura mediterránea. La fermentación y la oxidación son ejemplos de las primeras reacciones químicas llevadas a cabo por los sistemas biológicos y utilizadas por el hombre, sin ser consciente de ello, con fines biotecnológicos.

This *et al.* (2006) presentan una interesante revisión sobre el origen y la domesticación de esta especie. La vid se integra en la familia Vitaceae, de la que forman parte aproximadamente 1000 especies agrupadas en 17 géneros. De éstos, sólo el género *Vitis* tiene importancia agronómica real. Está integrado por 60 especies interfértiles de las cuales sólo la especie *Vitis vinifera* es utilizada en la producción de vino. Dentro de la especie se distinguen dos formas que conviven en Eurasia y en el Norte de África: la forma *V. vinifera* subespecie *vinifera* y la forma silvestre *V. vinifera* subespecie *silvestris*. La primera incluye todas las variedades desarrolladas como consecuencia del proceso de domesticación y es muy numerosa. La segunda incluye las formas salvajes de vid y es muy poco numerosa.

El origen de la vid data de hace al menos 65 millones de años. El proceso de domesticación determinó cambios drásticos en el patrimonio genético de la especie, cambios que afectaron a características muy diferentes, desde la formación de los frutos y los racimos y los hábitos reproductivos de las plantas a las características relacionadas con el rendimiento, la productividad y las propiedades de los vinos derivados. No existe por el momento una certidumbre absoluta sobre la identidad del área del planeta donde pudo tener lugar la domesticación de la vid, o si esta se produjo en áreas diferentes o si hubo domesticaciones secundarias. Las evidencias acumuladas sugieren que la vid fue domesticada en el Próximo Oriente. Según el Larousse do Vinho (2004), en la región del Cáucaso (este del Mar Negro) se han encontrado semillas de plantas de vid datadas del 8000 a.C. Parece ser, por lo tanto, que el primer viñedo del que existen vestigios fue plantado en algún lugar entre las actuales Turquía, Georgia o Armenia hace más de 10 milenios. Según This *et al.*, (2006), la primera evidencia en la producción del vino fue encontrada en Irán, en el Hajji Firuz Tepe, en el norte de los Montes Zagros, y data de los años 7400 – 7000 a.C. Es posible destacar las primeras evidencias directas de la producción de vino, que datan del año 3500 a.C., y consistentes en restos hallados en una excavación realizada en la ciudad de Kannish (Turquía), donde fue encontrada un ánfora en la que se halló una mancha de vino. Puede deducirse así, que la

viticultura como práctica agrícola encaminada a la producción del vino era practicada ya en el tercer y cuarto milenios a.C.

La viticultura se fue propagando poco a poco por Asia Menor y en dirección al Sur, hasta Siria y Egipto. Cuando el cultivo de la vid alcanzó Grecia, logró un gran éxito, influenciando sus religiones, costumbres e historia. Los navegantes fenicios fueron responsables de la difusión de la vid por el mediterráneo. Los romanos lograron grandes avances en la técnica del cultivo de la vid, siendo difundida desde Roma a todo el imperio romano, dando una especial importancia al cultivo de la vid en Francia, donde tuvo tal auge que fue necesario editar leyes especiales para la protección de la producción.

Hacia el 1500, época del descubrimiento de las Américas, los españoles fueron los responsables de la introducción de la especie *Vitis vinífera* L. en México y también en las provincias de Arizona y California en los Estados Unidos.

En 1860 apareció en el sur de Francia la filoxera, un pulgón que mata la vid nutriéndose de los fluidos de las raíces. El parásito llegó por accidente transportado en barcos a vapor provenientes de América del Norte y que podían atravesar el océano a una velocidad suficiente como para que el parásito presente en las plantas exportadas pudiese sobrevivir al viaje. Toda Europa fue afectada por la plaga. Después de cuarenta años de importantísimos daños causados por esta especie, se consiguió encontrar una solución basada en la utilización como patrones de cepas de vid de especies americanas, resistentes a la filoxera, sobre los que se injertaban las variedades europeas que se habían ido desarrollando en el viejo continente a lo largo de los años. Así se logró la inmunización del viñedo europeo. En la misma época, la vid fue atacada también de manera importante por oídio y mildiu.

La vid (*V. vinífera* L.) es una especie diploide y tiene un genoma pequeño, cuyo tamaño es de 475 – 500 Mb (es aproximadamente cuatro veces el tamaño del genoma de *Arabidopsis* y una sexta parte del tamaño del maíz) y tiene 38 cromosomas ($2n = 38$). El genotipo de las variedades de uva es altamente heterocigoto y prácticamente todas las variedades cultivadas son hermafroditas, auto-fértiles y de fácil cruzamiento.

Existen millares de cultivares de *V. vinífera*, pero el mercado global para la producción de vino está dominado por sólo unos pocos. Las cultivares son generalmente clasificadas en relación a su consumo final: producción de vino, de uva de mesa y de uva pasa (This *et al.*, 2006).

Su clasificación científica es la siguiente:

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Orden: *Vitales*
Familia: *Vitaceae*
Género: *Vitis*
Especie: *V. vinifera*

2.2 – EL CULTIVO DE LA VID

2.2.1 - LA VID EN EL MUNDO

La vid se cultiva en todos los continentes del planeta, tanto en el hemisferio Norte como en el hemisferio sur, y en más de 50 países, siendo Europa el referente, principalmente en la zona mediterránea, donde se dan las mejores condiciones climatológicas y edafológicas para su producción. Según datos presentados en la 9ª Asamblea General de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) celebrada en Oporto en 2011 (estadísticas presentadas por su Director sobre la situación de la viticultura mundial en 2010 y recogidas en el documento <http://news.reseau->

[concept.net/images/oiv_es/Client/DIAPORAMA_STATISTIQUES__AG_Porto_2011_EN.pdf](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/DIAPORAMA_STATISTIQUES__AG_Porto_2011_EN.pdf)) la superficie mundial de viñedo alcanzó en ese año casi los 7,6 millones de hectáreas (ha). El 57,4% de toda la superficie cultivada de vid se encuentra en Europa, el 21,6% en Asia, el 13,2% en América, el 5,2% en África y el 2,7% en Oceanía. España es el país con una mayor superficie de viñedo, casi 1,1 millones de ha (1,082 ha exactamente), seguido de Francia, con 825.000 ha, Italia, con 798.000 ha y Turquía, con 505.000 ha. Les siguen países como China, con 490.000 ha, Estados Unidos, con 404.000 ha, Irán, con 300.000 ha, Portugal, con 243.000 ha, Argentina, con 228.000 ha, Rumanía, con 204.000 ha, Chile, con 200.000 ha y Australia, con 170.000 ha. En los últimos años se está observando una reducción, moderada, en la superficie total cultivada en los países en los que más superficie se ha estado destinando a este cultivo, como España, Francia, Italia y Turquía, y un aumento también moderado, en países como China, Estados Unidos, Argentina, Chile y Australia.

Aunque España es el país con una mayor superficie de viñedo cultivada, no es el primer país productor de vino del planeta. Esta posición es ocupada por Italia, seguida muy de cerca por Francia y a continuación España. Completan la lista de los 12 mayores productores de vino Estados Unidos, Argentina, China, Australia, Suráfrica, Chile, Rusia, Portugal y Alemania.

2.2.2 - LA VID EN ESPAÑA

España tiene el viñedo más extenso del mundo y produce anualmente entre 5 y 6 millones de toneladas de uva. La mayor parte de la superficie cultivada se dedica a la producción de uva para vinificación, y sólo unas 37.000 ha se dedican a la producción de uva de mesa y una extensión aún menor (aproximadamente 4.000 ha) a la producción de uva para pasificación. Ciertamente desde el punto de vista económico es el sector dedicado a la producción de vino el que tiene una mayor importancia. En su conjunto, la producción de vid supone un 11% de la producción final agrícola de nuestro país, lo que demuestra la importancia estratégica de este cultivo en nuestra economía.

El cultivo de la vid se extiende por toda la geografía ibérica. Se trata de una especie que ha mostrado una excelente capacidad de adaptación a ambientes muy diversos y a condiciones climáticas y edafológicas muy distintas. En buena medida esta capacidad de adaptación explica la enorme diversidad de variedades autóctonas que se han cultivado en nuestro país, variedades muchas de ellas que presentan características muy peculiares y que llaman poderosísimamente la atención en la viticultura moderna. Durante muchos años el objetivo fundamental de la viticultura fue mejorar los rendimientos y la producción. La utilización generalizada de una serie, limitada, de variedades, y la estandarización de las técnicas de vinificación determinaron una uniformidad bastante notable en los vinos producidos en regiones, e incluso en países, muy distintos. Desde hace ya algunas décadas, el interés de los viticultores, condicionado por los deseos de los consumidores y de los mercados, ha ido cambiando buscando la mejora de la calidad y la presentación de las peculiaridades y especificidades de los vinos producidos a partir de variedades particulares cultivadas en regiones concretas. Es decir, la viticultura moderna progresa más buscando la calidad, la tipicidad y la especificidad que la cantidad. En este contexto España presenta ventajas importantes. Junto a las variedades de amplia difusión e implantación que se cultivan en amplias extensiones de nuestra geografía, los viticultores disponen de una amplísima colección de variedades autóctonas, muy diferentes entre sí, de características particulares, adaptadas cada una de ellas a unas condiciones también particulares y que permiten su utilización para producir vinos de características específicas y distintivas, muy atractivos para el consumidor.

El control de la producción y la calidad de los vinos elaborados en España han llevado a la creación de una compleja clasificación de regiones vitivinícolas. En el escalafón más alto se sitúan los Vinos de Calidad Producidos en una Región Determinada (V.C.P.R.D.) que, a su vez, se dividen en cuatro grupos: Vino de Pago, Denominación de Origen Calificada, Denominación de Origen y Vino de Calidad con Indicación Geográfica. El Vino de Pago es la más alta categoría que puede conseguir un vino elaborado en España. Se trata de vinos que se elaboran con el fruto obtenido de un viñedo que cuenta con unas características particulares, que lo hacen propio y distinto al resto de su entorno. La Denominación de Origen (DO) en España es subdividida en dos clasificaciones: las Denominaciones de Origen propiamente

dichas por una parte, y las Denominaciones de Origen Calificadas por otra. Las primeras, las Denominaciones de Origen propiamente dichas, corresponden a regiones delimitadas y la elaboración de sus vinos responde a unos parámetros de calidad y tipicidad reglamentadas por un Consejo Regulador que establece las vides autorizadas, los rendimientos del viñedo y los tiempos de crianza. Por otro lado, las Denominaciones de Origen Calificadas, que son una variante de las anteriores, corresponden a Denominaciones de Origen, que al menos durante 10 años, hayan contado con la distinción de Denominación de Origen. Hasta el momento, sólo la Rioja tuvo derecho a esa denominación y a partir de la cosecha 1991 (Larousse do Vinho, 2004). Antes de concederse la calificación de una Denominación de Origen es necesario que la zona correspondiente haya sido reconocida al menos durante 5 años con la distinción de Vino de Calidad con Indicación Geográfica.

En la actualidad existen 66 Denominaciones de Origen en la península y en las islas. Bajo la denominación de Vino de Pago hay 6 regiones, que son: Dominio de Valdepeña (Toledo), Dehesa del Carrizal (Ciudad Real), El Guijoso (Albacete), Finca Elez (Albacete), Otazu (Navarra) y Señorío de Arínzano (Navarra).

Las Denominaciones de Origen del Vino de Rioja y Ribera del Duero son las más reconocidas tanto dentro como fuera de España, contando con gran prestigio internacional. Ribera del Duero, que tiene un área de plantación de 20.711 hectáreas, cuenta con 241 bodegas. Por su parte, Rioja reúne 1.205 bodegas y cuenta con una extensión de 63.560 hectáreas (Fernández, 2009). Según el Larousse do Vinho (2004), La Rioja, Navarra y Aragón, Castilla y León, Cataluña, Galicia y el País Vasco, Centro y Sur de España, Jerez y Málaga, son las regiones con las Denominaciones de Origen del vino más importantes de España.

La principal característica del viñedo español es su diversidad. Se cultiva en altitudes muy distintas (hasta 1000 m de altitud), en condiciones climáticas muy diferentes, en regiones que experimentan diferencias de temperatura de invierno a verano de -10°C a 40°C, en zonas que muestran una amplitud térmica del día a la noche de 20°C, y en muy diferentes tipos de suelo. En muchas áreas pobres y secas de la geografía española, en particular en la zona centro, la vid es casi el único cultivo que puede prosperar. Esta diversidad de ambientes y su utilización milenaria ha determinado la obtención de una gran diversidad de formas locales, de variedades adaptadas, que constituyen un patrimonio genético de enorme valor agronómico que se suman a las variedades más generalistas de amplia difusión a nivel nacional e internacional. De una forma general se puede decir que el Norte de España produce vinos no fortificados de calidad, en el Centro, vino de consumo, más corriente y en el Sur vinos de aperitivo, como el Xerez, o vinos de postre.

Las variedades tintas internacionales cultivadas en España son: Cabernet Sauvignon (cultivada en casi todas las zonas que elaboran vino tinto), Merlot (Cataluña, Navarra, Ribera del Duero, Huesca, Alicante y Murcia), Pinot Noir (Cataluña), Shyrah o Shiraz (Castilla la Mancha, Murcia). Entre las variedades tintas autóctonas de España destacan: Bobal (Valencia), Cariñena o Mazuelo (Cataluña, La Rioja y Navarra), Garnacha tinta / Aragonés / Tinto Aragón

(La Rioja, Madrid, Navarra, Toledo, Zaragoza y Cataluña), Graciano (Navarra y La Rioja), Mencía (Asturias, Santander, León y Galicia), Monastrell o Mourvèdre (Francia) (Levante, Cataluña y Albacete) y la Tempranillo cultivada en La Rioja, Castilla La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Navarra y Madrid (www.sabormediterraneo.com).

Las principales variedades blancas internacionales cultivadas en España son: Chardonnay (Cataluña, Navarra y Huesca), Gewürztraminer (Cataluña y Huesca), Riesling (Cataluña y Huesca), Sauvignon Blanc (Cataluña y Castilla y León). Las variedades blancas autóctonas de España más importantes son: Airén (Castilla La Mancha, Murcia y Córdoba), Albariño o Alvarinho (Portugal) (Galicia), Godello (Galicia y León), Macabeo o Viura (Cataluña, Navarra, La Rioja, Valladolid, Extremadura, Castilla La Mancha), Malvasía o Subirat (Cataluña, Aragón, Navarra, Canarias, La Rioja y Valencia), Moscatel de Alejandría (Málaga y Valencia), Moscatel Menudo o Muscat (Navarra y Cataluña), Palomino Fino o Jerez o Listán (Cádiz, Canarias, Galicia, León, Valladolid, Zamora y Huelva), Parellada (Cataluña), Pedro Ximénez (Córdoba, Málaga y Cádiz), Treixadura (Galicia), Verdejo (Valladolid), Xarel.lo (Cataluña).

Por su elegancia y su carácter aromático, la Tempranillo (también conocida como Ull de Llebre, Cencibel, Tinto Fino, Tinto del País y Tinta de Toro) es la preferida entre las cepas tintas de España. Es la cepa principal en Castilla – La Mancha, en Castilla y León, y de ciertas partes del valle del Duero y Levante, y quizás tenga su origen común con la cepa francesa Pinot Noir.

2.2.3 - LA VID EN CASTILLA Y LEÓN

El cultivo de la vid y la producción de vino se han consolidado como actividades clave en la industria agroalimentaria en Castilla y León, Comunidad que ocupa ya en la actualidad un lugar privilegiado en el mapa vitivinícola español. La superficie agraria de viñedo en Castilla y León asciende a 70.746 ha y su producción agraria supone 270.679 t.

La comunidad autónoma de Castilla y León cuenta con 9 Denominaciones de Origen del vino. Ribera del Duero, Cigales, Rueda, Toro y Bierzo son las Denominaciones de Origen más antiguas y con más larga tradición en la Comunidad. En el año 2007 se incorporaron cuatro nuevas Denominaciones de Origen: Tierra del Vino de Zamora, Arlanza, Tierra de León y Arribes. Otras zonas con menciones de calidad en Castilla y León son Valles de Benavente y Valtiendas, ambas reconocidas con la mención de Vinos de Calidad (VC).

La mención Vino de la Tierra de Castilla y León es la mención que ampara todos los vinos producidos en la Comunidad, siempre que los municipios productores sean aptos para el cultivo del viñedo. Esta es una fórmula muy interesante para muchas zonas, y bodegas ubicadas en las mismas, que carecen de un Consejo Regulador o de una mención de calidad propios y que, por lo tanto, no han podido acogerse a los beneficios que en cuanto al reconocimiento de criterios de calidad y selección supone la pertenencia a los mismos. Esta

figura permite amparar sus vinos, al menos, temporalmente, en muchos casos a la espera de la obtención de una mención de denominación de calidad propia. Es el caso, por ejemplo, de la Sierra de Salamanca, en Salamanca.

Ribera del Duero es la DO más importante del valle del Duero y de Castilla y León. El viñedo de esta denominación va de Soria hasta Valladolid, a una altitud situada entre 700 y 800 metros. El suelo es profundo, leve y arenoso, que recubre una capa de arcilla con afloramientos de calcáreo. Por estar ubicada en una zona límite para la producción de vino, logra producir apenas 24 hl/ha. Las uvas tienen buena acidez y los vinos son excelentes y caros. La cepa Tempranillo ocupa 60% de la superficie cultivada. Valbuena, la región de Vega Sicilia y otros pueblos, han sido autorizados a replantar con cepas bordelesas.

Rueda fue atacada por la filoxera en el siglo XIX y después de este evento, fue replantada con la cepa Palomino. Su prestigio empezó con la casa Marqués de Riscal, que decidió invertir en la cepa Verdejo, para la producción de vino blanco. Los viñedos de esta región están ubicados a una altitud de 600 a 780 m. Sus mejores parcelas se localizan cerca del Duero, en suelos ricos en hierro y con una camada de calcáreo. El clima es continental. La cepa más importante es la Verdejo (47% del viñedo), seguida por Palomino (25%) y Viura (21%).

Cigales está ubicada al norte de las denominaciones de Ribera del Duero y Rueda. Es una DO productora de excelentes vinos tintos y con un futuro muy prometedor. El viñedo está plantado en una altitud de 800 m. El clima también es continental, pero tiene una buena pluviometría que conviene al cultivo de la vid. La principal cepa es la Tempranillo (50%), seguida por Garnacha Tinta (30%) y por Garnacha Gris. Los vinos blancos son producidos principalmente a partir de las variedades Verdejo y Viura, pero también de Palomino y de Albillo, que representan el 20% del viñedo.

Toro es una denominación de origen con tradición. Sirve vinos a los intelectuales de la Universidad de Salamanca desde 1215. Es un vino obstinado, potente y con una característica marcadamente castellana. Es conocida como Tierra del Vino desde remotos tiempos, debido a que se dedicaba de manera preferente a la producción de esta bebida, en contraste con las planicies cerealistas de Castilla, llamadas Tierra del Pan. El viñedo está ubicado entre 600 y 750 m de altitud, en un suelo calcáreo al norte y más al Sur, cerca del Duero y del Guareña, en un suelo más aluvial. El clima es continental con lluvias inesperadas. Las cepas de esta DO son la Tempranillo (conocida como Tinta de Toro), que ocupa el 58% de los viñedos. La legislación de la DO certifica que los vinos producidos en esta región deben contener un mínimo de 75% de la Tempranillo y un cuarto de uno cualquiera de los vinos tintos que sirven a la producción del crianza.

Bierzo está ubicado al Norte de Castilla y León, al lado de la DO Valdeorras, localizada al otro lado del río Sil, en Galicia. Los viñedos están plantados a una altura de 500 y 650 m. El suelo está compuesto por aluviones en la parte baja y en la alta de pizarra, y recubierto de una camada arable muy fértil y profunda. El clima es templado y muy soleado. La principal cepa

tinta es la Mencía (62%), que es plantada casi exclusivamente en Bierzo y Valdeorras. Tiene supuestamente un ancestro común con la variedad Cabernet Franc. La segunda cepa tinta es la Garnacha Tintorera. Las cepas blancas de calidad son Godello, Doña Blanca y Palomino.

Arribes ha recibido en 2007, la designación de Denominación de Origen del vino. Incluye una serie de términos municipales de las provincias de Salamanca y Zamora en su zona más occidental, limitando con Portugal. Las variedades tintas utilizadas son Tempranillo, Juan García y Rufete, seguidas de Garnacha y Mencía. En las variedades blancas la Malvasía es la más utilizada, seguida de Albillo y Verdejo (www.mapa.es). Es interesante destacar que la variedad Juan García, mayoritaria en la zona, es una variedad autóctona, muy interesante, de probadas aptitudes para la producción de vinos y de una gran complejidad e incorporada en los vinos más destacados de la Denominación de Origen, tanto tintos jóvenes como crianzas, reservas y grandes reservas, así como rosados jóvenes.

Arlanza obtuvo también la Denominación de Origen en 2007. Esta DO está ubicada en la provincia de Burgos y algunos términos municipales de Palencia. Las variedades tintas utilizadas son mayoritariamente la Tinta del País, seguido por Mencía, Garnacha, Cabernet Sauvignon, Merlot y Petit Verdot. Las cepas blancas son la Albillo y la Viura.

Tierra de León se ha reconocido con VCPRD en 2004, dentro del nivel de “vino de calidad con indicación geográfica”. Está delimitada por los términos municipales de las provincias de León (mayoritariamente) y Valladolid. Según la Revista Vinos de España, esta región ya es una denominación de origen. Produce las variedades tintas Mencía y Prieto Picudo, seguidos de Tempranillo y Garnacha. Las variedades blancas son compuestas por Verdejo, Albarín blanco y Godello, seguidos por Malvasía y Palomino.

Tierra del Vino de Zamora fue reconocido como VCPRD en 2004, dentro del nivel de “vino de calidad con indicación geográfica”. Está delimitada por las provincias de Salamanca y Zamora (mayoritariamente). Las variedades tintas utilizadas son principalmente Tempranillo y Garnacha, seguidos por Cabernet Sauvignon. Las variedades blancas son la Malvasía, la Moscatel y la Verdejo, seguidas por Albillo, Palomino y Godello.

2.3 – *BOTRYTIS CINEREA* EN EL CULTIVO DE LA VID

2.3.1 – SINTOMATOLOGÍA EN VID Y EFECTOS SOBRE EL CULTIVO

La podredumbre gris causada por *B. cinerea* es una de las principales enfermedades de la vid. Ha existido desde siempre en los viñedos europeos y en general en todo el mundo manifestándose con mayor o menor intensidad según la climatología, sensibilidad de la variedad cultivada, injerto, sistema de conducción de las cepas que asegure una mayor aireación, abonado y situación del cultivo de la vid en zonas de ladera o valles más o menos cerrados donde la humedad ambiente es mayor. Los climas templados y húmedos favorecen la incidencia de *B. cinerea*. El patógeno puede vivir como saprofito sobre tejidos muertos o

senescentes y como patógeno con carácter polífago en plantas vivas (hortícolas, arbóreas y ornamentales). El hongo está presente en la viña a lo largo de todo el ciclo vegetativo de ésta, aumentando su presencia progresivamente hasta la maduración y favoreciéndose su diseminación por medio de la acción del agua, del viento y de insectos. En el contexto de la agricultura de nuestra Comunidad Autónoma, Castilla y León, *B. cinerea* es un patógeno ciertamente importante que causa importantes pérdidas económicas año tras año, siendo su incidencia particularmente notable durante aquellas campañas más lluviosas.

La podredumbre gris afecta a todas las partes de la vid, principalmente a las ramas, hojas e inflorescencias, siendo los daños en los racimos los más severos. En éstos ocurre una decoloración en la cubierta más externa de la uva, que se vuelve flácida y adquiere un color gris, pudriéndose en seguida. Si la infección ocurre cuando el racimo aún está verde, hace que la fruta se vuelva agria y puede determinar la caída del fruto del racimo. Al final de la floración las bayas jóvenes abortadas pueden ser colonizadas por el hongo y ser utilizadas como reservorio saprofito para un posterior ataque sobre las uvas (Viret *et al.*, 2004). Causa el deterioro del fruto en pre y pos-cosecha, siendo en general las variedades blancas más susceptibles que las variedades tintas. En aquéllas se facilita la visión del progreso de la infección al adquirir las uvas progresivamente un color marrón claro a partir del punto de contaminación (Fig. 4 A).

En los viñedos donde la primavera es frecuentemente lluviosa, se pueden observar los ataques en ramas jóvenes. Se manifiesta por una necrosis marrón que se puede recubrir por las fructificaciones del hongo. La zona necrosada suele mostrar bordes irregulares y generalmente se marchita, rompiéndose posteriormente la rama por debajo de la zona debilitada. Sobre las hojas cuando ocurre infección se observan manchas ocres situadas al borde del limbo y de forma triangular que en general no suelen tener una gran incidencia. El ataque sobre los pedicelos se traduce en pequeñas manchas marrones que, según las condiciones climáticas, pueden invadir la parte de las bayas cercanas a la necrosis.

En los viñedos de zonas más cálidas el hongo también ataca los pedúnculos de los racimos, produciendo su caída o marchitamiento. Cuando la baya está completamente colonizada, enseguida se ven aparecer los conidióforos o cuerpos fructíferos en la superficie de la uva. Si la contaminación se realiza por conidios, se aprecian pequeñas manchas de color marrón claro sobre la baya, que progresivamente se expanden hasta colonizar toda la uva. A partir de una baya atacada, el hongo se va a desarrollar para invadir la totalidad del racimo (Fig. 4 B).

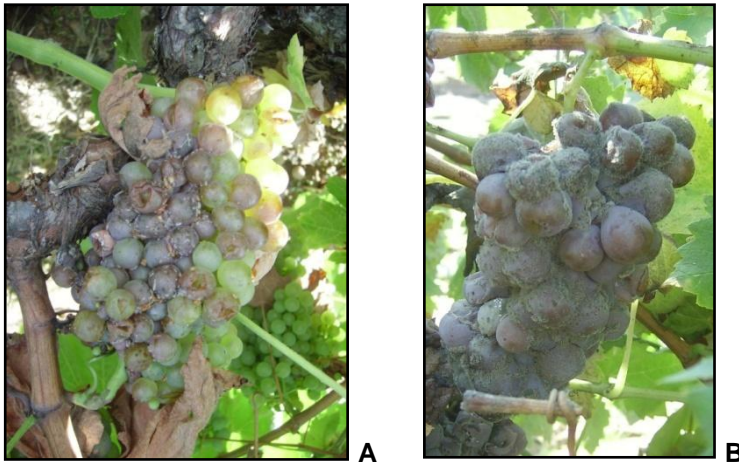


Figura 4. Infección de *B. cinerea* sobre vid. A - variedad Verdejo (Peñafiel, Burgos); B - variedad Malvasía (Toro, Zamora).

Durante el reposo vegetativo de los viñedos, sobre todo en viñedos vendimiados mecánicamente, se pueden observar en los sarmientos unas pequeñas prominencias negras y duras de dimensiones variables llamadas esclerocios. Asimismo, los sarmientos pueden presentar un micelio blanquecino indicativo de la presencia del hongo. A la primavera siguiente, los esclerocios y el micelio de las zonas blanquecinas, que han actuado como formas resistentes durante el invierno, fructifican produciendo conidios.

Los síntomas durante el almacenamiento en frío de la uva de mesa se manifiestan como unas necrosis de color marrón claro y de forma circular que acaban invadiendo toda la uva. Se puede desarrollar una podredumbre húmeda sobre el raquis que se recubre de un micelio estéril gris. La podredumbre se expande por proximidad de unos racimos a otros.

Con frecuencia el hongo alcanza, y está presente, en los tejidos florales ya antes y durante la fase de floración y, condicionado por factores que aún no han sido claramente identificados, puede permanecer en un estado latente hasta la maduración del fruto, que es cuando el patógeno reactiva su crecimiento y ocurre la penetración. Por esta razón el control frente a este patógeno debe ser un control preventivo y, aunque las plantas en el viñedo se muestren asintomáticas, se suelen llevar a cabo aplicaciones preventivas y periódicas con los fungicidas apropiados.

A pesar de los devastadores efectos que tiene la infección por *B. cinerea* en el viñedo, bajo determinadas condiciones climáticas este patógeno puede producir un tipo de infección que tiene interés industrial y comercial. Las condiciones ideales para el desarrollo de *B. cinerea* son una alta humedad relativa y una temperatura entre 18°C y 22°C. En estas condiciones el hongo crece muy rápidamente, coloniza los tejidos infectados y esporula activamente sobre su superficie, destruyendo completamente los frutos y los racimos. Hablamos entonces de la "podredumbre gris" a la que nos hemos estado refiriendo hasta ahora. Pero si durante las primeras horas del día se dan condiciones de humedad elevada y temperatura fresca o

templada, que favorecen el crecimiento del hongo, y posteriormente suben las temperaturas y el racimo queda expuesto a un ambiente seco y caldeado, el hongo, que ya ha penetrado en el interior del fruto a través de poros, de aberturas naturales o de micro-roturas, se desarrolla ahora muy lentamente. Este crecimiento del hongo determina una deshidratación lenta del fruto y un aumento de la concentración de azúcares sin que aumente la acidez. Y, desde luego, sin que los frutos lleguen a pudrirse. Este tipo de infección, denominada la "podredumbre noble", da lugar a unos vinos dulces de características muy peculiares y muy apreciadas, preparados en la mayor parte de los casos a partir de variedades blancas, en particular variedades con una piel de las bayas muy fina. Son vinos derivados de la podredumbre noble los famosos vinos de Sauternes en Francia, los vinos de Tokaj, en Hungría y los vinos de Auslese, Beerenauslesen y Trockenbeerenauslesen en Alemania. En España se ha producido vinos botrytizados en algunas añadas en Valdeorras (Guitián) y en la cepa albariño en Rías Baixas, Galicia. En Navarra, la bodega Castillo de Monjardín también ha logrado producir este tipo de vino.

2.3.1.1 – DAÑOS CUALITATIVOS

La infección por *B. cinerea* en la vid da lugar a cambios bioquímicos en el zumo que determinan alteraciones en el sabor, olor y claridad del vino. El cambio más importante es la producción de lacasas (enzimas fenol oxidasas), que reducen la claridad del vino y oxidan otros componentes que contribuyen a proporcionar la apariencia, sabor, textura, fragancia y propiedades antimicrobianas del vino (Jackson, 1994).

Los daños cualitativos más importantes que se pueden producir como consecuencia de la infección por *B. cinerea* en los racimos de vid se resumen de la siguiente manera:

- Alteraciones en el metabolismo de azúcares y ácidos. El ataque del patógeno en los racimos se manifiesta en primer lugar por un aumento del nivel de los azúcares, seguido de un fenómeno de concentración de éstos. En este estado, rápidamente, y sobre todo coincidiendo con la salida de los conidióforos, el hongo experimenta un fuerte consumo de glucosa. Al mismo tiempo, se elevan los niveles de ácido glucónico y de glicerol. El ácido glucónico se combina con el SO₂ durante la vinificación produciendo así su inactivación y el consecuente efecto en la calidad del vino.
- Oxidación enzimática de compuestos fenólicos. *Botrytis* produce fenol oxidasas en cantidades directamente proporcionales al nivel de podredumbre gris en la vendimia. Estas enzimas son muy estables y responsables de la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos responsables del color y aromas en los vinos tintos. De esta forma, los vinos tintos toman un color marrón con olores y sabores desagradables. La presencia de lacasas, además, limita el uso de la termo-vinificación, una técnica utilizada para liberar antocianinas de la piel de la uva y que aumenta el color del vino, especialmente en variedades como

Pinot Noir (Jackson, 1994). Las lacasas son fácilmente solubles, razón por la cual no son removidas fácilmente mediante la mayor parte de las técnicas de clarificación.

- Alteraciones en el aroma de los vinos. En los vinos de variedad Moscatel el ataque de *B. cinerea* produce la reducción de terpenos responsables del aroma de los mostos. En la variedad Sauvignon, las quinonas producidas por la oxidación de los compuestos fenólicos reaccionan con los precursores de aromas destruyendo los sabores propios de esta uva.
- Producción de polisacáridos. *B. cinerea* produce polisacáridos extracelulares, glucanos, de forma muy abundante. Su acumulación en el medio extracelular dificultan considerablemente las operaciones de filtración y clarificación de los vinos.
- Efectos indirectos. La necesidad de recoger la cosecha de manera temprana para evitar el desarrollo invasivo del patógeno y reducir los posibles daños ocasionados por el hongo puede reducir la calidad de los vinos drásticamente.

2.3.1.2 – DAÑOS CUANTITATIVOS

Antes y durante la floración las inflorescencias se pueden marchitar, aunque generalmente sólo se producen pequeñas pérdidas del futuro racimo. El daño producido en este estado es difícilmente calculable y se podría decir que se trata de un aclarado de la fruta natural. Desde el inicio de la maduración a la recolección las pérdidas son considerables sobre todo si las condiciones climáticas favorecen la infección del hongo. En Francia el daño producido por *B. cinerea* en viñedos se estima entre un 15 a un 40% de la cosecha dependiendo de las condiciones climáticas. Aunque es difícil encontrar datos sobre el valor de las pérdidas producidas en los viñedos de Castilla y León, y aunque los valores dependen de las campañas, de las áreas geográficas y de las condiciones climáticas, en aquellas campañas en las que se producen abundantes lluvias en las semanas previas a la vendimia durante la segunda quincena de Septiembre los viticultores y los Consejos Reguladores de las distintas DO de la región cuantifican las pérdidas con porcentajes que llegan a alcanzar entre el 30 y el 40% de la producción. En algunos casos las pérdidas son consecuencia directa de la imposibilidad de recoger una parte importante de la cosecha, que queda en el campo, y en otras son consecuencia de la pérdida de calidad de los vinos derivados de frutos que han estado en contacto con el patógeno.

2.3.2 – FACTORES QUE AFECTAN A LA ENFERMEDAD

El establecimiento de la enfermedad es un proceso complejo en el que influyen numerosos y muy distintos factores. Teniendo en cuenta que la enfermedad es un proceso

derivado de la interacción de dos organismos vivos, la planta y el patógeno, que entran en contacto en un ambiente dado, es posible considerar un criterio sencillo de clasificación para reflexionar sobre los factores que van a condicionar el establecimiento y el progreso de la enfermedad basado en la naturaleza de tales factores.

2.3.2.1 – FACTORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS

Planta y patógeno interactúan en un ambiente dado, sometidos a los condicionamientos climáticos y edafológicos particulares de cada entorno en el que conviven en cada caso, además, con otros muchos organismos.

En secciones anteriores ya hemos considerado las condiciones ambientales más favorables en cuanto a humedad relativa y a temperatura para el desarrollo de la podredumbre gris en las distintas fases del cultivo de la vid. Ciertamente el clima ejerce un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad. Pero no sólo en las semanas anteriores a la vendimia, sino también durante y después de la floración. De este modo, las lluvias durante y después de la floración condicionan el estado fisiológico de la cutícula de las bayas haciéndolas más vulnerables al ataque de *B. cinerea*. También el granizo y la lluvia violenta pueden ocasionar lesiones en las bayas que facilitan la infección por el hongo.

La profundidad del suelo tiene una gran influencia sobre el desarrollo de la podredumbre gris. Un suelo profundo favorece un enraizamiento profundo y un suelo poco profundo, lo contrario. De este modo, si el suelo es profundo, la absorción de agua por la planta es débil y no se produce un aumento del contenido del agua de las bayas. Sin embargo, si el enraizamiento es superficial, la absorción de agua es muy rápida, las bayas se llenan de agua y son más sensibles al hongo.

Los factores biológicos que pueden afectar al progreso del hongo pueden ser varios. Por un lado es necesario considerar la acción de los insectos. Las larvas de ciertos insectos, como las polillas *Lobesia botrana* y *Epiphyas postvittana*, y las moscas del género *Drosophila*, actúan como vehículos de transporte del inóculo del hongo, facilitando la entrada en los frutos mediante las galerías que producen, y favoreciendo la germinación de los conidios con sus deposiciones (Elmer and Michailides, 2004). Por otro lado, la rotura de las bayas que produce el oídio (*Uncinula necator* Burr.) favorece el desarrollo posterior de *B. cinerea* al facilitar la entrada del patógeno en el fruto.

Tampoco podemos olvidar la influencia que tiene la intervención humana en el cultivo. La elección del porta injerto influye en la tasa de podredumbre gris y la utilización de fertilizantes nitrogenados puede afectar el desarrollo de la enfermedad y a las tasas de nitrógeno en el mosto. La forma de mantenimiento del suelo influye en el enraizado de las plantas y consecuentemente en su absorción de agua y nitrógeno, determinando el vigor de las

plantas y el tamaño de las bayas y su llenado. Por último, la forma de poda y el entresacado de los racimos influyen en la aireación y en el riesgo de desarrollo de la enfermedad.

2.3.2.2. – FACTORES GENÉTICOS

2.3.2.2.1. - SENSIBILIDAD DEL HUÉSPED

El estudio de la sensibilidad de las distintas variedades de vid a la podredumbre gris tiene una gran importancia económica. En una situación ideal la utilización de variedades de vid resistentes a *B. cinerea* constituiría la mejor opción, tanto desde un punto de vista económico como de conservación del medio ambiente, para mantener controlada la enfermedad en el campo y reducir su incidencia. Esta estrategia, como en cualquier otro cultivo, exige la existencia de variedades portadoras de genes de resistencia efectivos frente al patógeno. Desafortunadamente en esta especie vegetal no se han descrito genes mayores de resistencia a *B. cinerea*. Pero sí se detectan diferencias en la susceptibilidad de las distintas variedades al patógeno. Dadas las características de la biología y del sistema reproductivo de esta especie y los métodos de propagación utilizados no resulta sencillo llevar a cabo una evaluación de las bases genéticas de estas diferencias. La situación es probablemente muy similar en otras especies vegetales susceptibles también a *B. cinerea*. Las evidencias experimentales obtenidas en distintos sistemas sugieren que la capacidad del patógeno para infectar a su huésped es un carácter complejo, poligénico, y que la posible resistencia (o menor susceptibilidad) de determinadas variedades del huésped es también un carácter poligénico. Aunque no se han identificado con precisión los factores que participan en la determinación de este comportamiento, sí se han ido acumulando observaciones que permiten deducir la naturaleza de algunos de ellos.

La arquitectura del racimo es uno de los factores más importantes que influyen en las diferencias de sensibilidad observadas en las diferentes variedades. Las cepas con racimos compactos, donde la podredumbre se puede desarrollar más fácilmente por proximidad, son en general más sensibles que las cepas con racimos más abiertos y menos densos. Así, la misma cepa de *B. cinerea* puede tener diferente respuesta en virulencia dependiendo de la variedad de vid infectada (Vallejo *et al.*, 2003).

Las fitoalexinas producidas por la planta tienen un efecto antimicrobiano que frena el desarrollo del patógeno (Jeandet *et al.*, 2002). Variaciones en la producción de fitoalexinas entre distintas variedades o en la capacidad del patógeno para degradar las fitoalexinas producidas causan un efecto directo en la infección producida por *B. cinerea* (Kliebenstein *et al.*, 2005).

Otro factor importante es la organización y composición de la epidermis de los tejidos vegetales. Las variedades más resistentes presentan una epidermis más difícilmente

franqueable por *Botrytis*. La cantidad y calidad de las pectinas constituyen una de las mayores barreras celulares, así como la cantidad de los compuestos fenólicos (Lionetti *et al.*, 2007; Valette-Collet *et al.*, 2003). Así, las variedades menos resistentes tienen mayor cantidad de pectinas solubles en agua que serán más fácilmente degradables por el hongo y una menor cantidad de compuestos fenólicos.

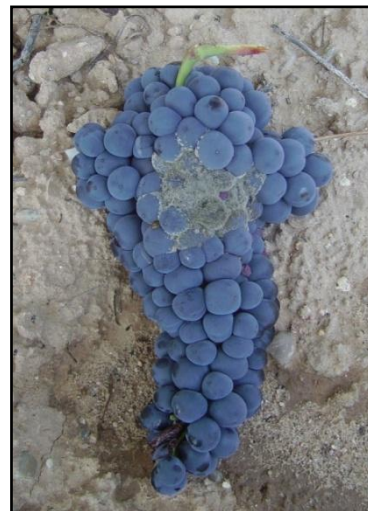
La receptividad de los órganos vegetales está bien delimitada en el tiempo. Las hojas y las ramas son atacadas en los estados juveniles, las inflorescencias son siempre receptivas, incluidos el raquis y los botones florales, y las uvas no suelen ser receptivas hasta el inicio de su maduración.

Todas estas características tienen, indudablemente, una base genética, lo que hace factible considerar la mejora de la resistencia (o tolerancia) a *B. cinerea* en vid tratando de generar las mejores combinaciones de los factores genéticos implicados en la determinación de las variantes fenotípicas más interesantes en cada caso. Pero ciertamente en el caso de la vid resulta particularmente complicado y costoso.

En la figura 5 se presenta un ejemplo de la infección de *B. cinerea* sobre Malvasía y Tinta del País, dos variedades que muestran una alta sensibilidad a la enfermedad. Otras variedades de uso común en España, como la Merlot o la Cabernet Sauvignon, tienen una mejor resistencia a la enfermedad principalmente por la configuración de sus racimos.



A



B

Figura 5. Infección de *B. cinerea* sobre racimos de vid. A - Infección sobre la variedad Malvasía en la denominación de origen Toro (Zamora). B - Infección sobre la variedad Tinta del País en la denominación de origen Ribera del Duero (Burgos).

2.3.2.2.2. - AGRESIVIDAD DEL PATÓGENO

A la hora de analizar la capacidad *B. cinerea* para infectar a sus huéspedes y las diferencias de agresividad entre unos aislados y otros es necesario considerar, de manera general, dos aspectos distintos, cada uno de ellos, a su vez, muy complejo.

En primer lugar es necesario tener en cuenta las características y la naturaleza de *B. cinerea* como patógeno. Se trata de un patógeno generalista, que ataca a un amplísimo rango de huéspedes y que, en general, puede atacar a cada huésped particular en muy distintas fases del ciclo del cultivo, incluso durante la postcosecha. A diferencia de otras especies del género, la literatura científica recoge que *B. cinerea* no muestra especificidad ni de huésped ni de órgano. Es un buen modelo entonces para estudiar la naturaleza de "patógeno general". Es, además, un patógeno necrótrofo, es decir, que primero mata las células del tejido del huésped y luego coloniza el tejido muerto. La comunidad científica que trabaja en *B. cinerea* ha trabajado muy intensamente tratando de determinar la naturaleza de los factores implicados en la determinación de estas habilidades, asumiendo que la "patogenicidad" de *B. cinerea* es un carácter complejo, multigénico, de variación continua. Los análisis llevados a cabo para diseccionar "genéticamente" los mecanismos de patogenicidad y para caracterizar molecularmente su naturaleza apuntan en este sentido. Tudzynski y Kokkelink presentan una excelente y muy reciente revisión sobre los factores individuales que han sido analizados desde un punto de vista funcional mediante la obtención de mutantes para determinar si juegan o no un papel esencial en la capacidad de infección del patógeno (Tudzynski and Kokkelink, 2009). La mayoría de ellos fueron seleccionados como genes o factores "candidato" teniendo en cuenta precisamente las características particulares del patógeno. Entre ellos podemos citar genes implicados en desarrollo, en la formación de estructuras de penetración, en la degradación de la pared celular, en la producción de compuestos fitotóxicos, de ácidos orgánicos, de fitohormonas, en la producción y/o detoxificación de formas activas de oxígeno, en procesos de señalización, de modulación de las respuestas de defensa de la planta. En el momento de aparición de esta revisión la lista de genes caracterizados de esta manera ascendía a 102. De los mutantes correspondientes, sólo un número muy reducido muestra alteraciones importantes en su capacidad para infectar a la planta huésped. En la mayor parte de los casos los efectos de las mutaciones son indetectables o muy reducidos. La opinión generalizada es que, efectivamente, son muchos los factores que contribuyen a determinar la patogenicidad de *B. cinerea*, cada uno de los cuales contribuye proporcionando y perfilando habilidades y capacidades particulares del patógeno. Un aislado concreto del patógeno reúne una combinación particular de variantes de estos múltiples factores que determina su capacidad de infección.

Una segunda cuestión que es necesario tener en cuenta en el caso de *B. cinerea* es la inusual variabilidad que caracteriza a esta especie y que dificulta su control. Esta variabilidad es evidente en características tales como la patogenicidad (Lorenz, 1983), la capacidad y los

patrones de crecimiento (Grindle, 1979), la producción de enzimas *in vitro* e *in vivo* (Leone, 1990) o la resistencia a fungicidas que aparecen rápidamente en el campo cuando se aplican agentes químicos para proteger los cultivos (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 1996). El origen de esta variabilidad fenotípica y, por lo tanto, genética, y los mecanismos responsables de la misma aún no se comprenden de manera adecuada, aunque empezamos a tener algunas respuestas a la luz del conocimiento de la biología y del ciclo de vida del hongo. La aparición natural de mutaciones, la reproducción sexual, la multiplicación asexual, la existencia de compatibilidad vegetativa, la posibilidad de formación de heterocariontes, la actividad de elementos génicos transponibles, son procesos y mecanismos que hemos considerado en secciones previas y que ciertamente pueden contribuir a explicar la diversidad fenotípica que encontramos en la naturaleza para esta especie.

Cuando nos enfrentamos a un patógeno como *B. cinerea* debemos pensar no en un único tipo fisiológico y genético, o en unos pocos tipos, representados más o menos frecuentemente en una población dada del patógeno. Las poblaciones naturales de *B. cinerea* están integradas por tipos muy distintos y son enormemente heterogéneas: prácticamente cada individuo es distinto de todos y cada uno de los demás individuos que forman parte de su misma población. La diversidad genética existente es muy importante y esta diversidad se estructura en las poblaciones condicionada por diversos factores que determinan, además, cambios en la estructura genética de la población de generación en generación. El estudio del patógeno, por lo tanto, y el desarrollo de posibles estrategias de control exigen considerar y estudiar al patógeno a nivel poblacional y comprender la dinámica de la población sometida a los condicionamientos propios de cada ambiente particular. Clásicamente los estudios poblacionales en *B. cinerea* se han basado en la utilización de marcadores fisiológicos y en sus genes determinantes, como la resistencia a fungicidas. Con el desarrollo durante las últimas dos décadas de un buen número de marcadores moleculares que permiten acceder directamente a la variabilidad en la propia molécula portadora de información genética, se han llevado a cabo numerosos estudios en poblaciones naturales de *B. cinerea* encaminados a cuantificar la diversidad genética existente en las mismas y a comprender su dinámica en respuesta a factores distintos, tales como la aplicación de determinados tratamientos de control químico o la posible adaptación a un huésped particular. En la sección 4 de la introducción de esta memoria presentamos una breve revisión sobre estos aspectos de la genética de poblaciones en *B. cinerea*.

3 - MARCADORES MOLECULARES

3.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

Desde la prehistoria el hombre ha llevado a cabo selección, durante mucho tiempo de manera inconsciente, tratando de mejorar su producción agrícola y ganadera para su manutención. Seleccionando los mejores individuos con características tales como mayor producción lechera o mejor resistencia a enfermedades, el hombre estaba practicando la mejora genética haciendo uso de los primeros marcadores genéticos. Esta selección es posible debido a que existe gran variabilidad genética en las poblaciones de individuos y a que los caracteres deseados están determinados por unidades informativas que son transmitidas a los descendientes. Cabe destacar, por otra parte, que en el ámbito de la taxonomía los caracteres morfológicos siempre fueron utilizados para la caracterización y clasificación de las especies.

La existencia de variabilidad en la naturaleza es una realidad obvia que el observador percibe de manera inmediata y su análisis constituye uno de los objetivos fundamentales de la genética. De hecho, la genética nace como ciencia formal para considerar "el estudio de la herencia y de la variación" (Griffiths and Orr, 1999). El desarrollo y la generalización de las técnicas de biología molecular han tenido consecuencias trascendentales en los avances recientes de la genética, avances que tienen su origen fundamentalmente en dos tipos de contribuciones, ambas derivadas de las posibilidades que nos ofrecen para generar marcadores moleculares. En primer lugar, la capacidad que nos proporcionan para llevar a cabo análisis genético, tanto de sistemas simples como complejos y tanto en estudios básicos como aplicados. Y en segundo lugar, la visión mucho más precisa y detallada que nos proporcionan sobre la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales y sobre en el que esta variabilidad se estructura.

Los marcadores genéticos son la herramienta básica de la genética y del análisis genético. ¿Cómo podemos definir "marcador genético"? Clásicamente, "marcador genético" ha sido definido como "cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético". Efectivamente, una diferencia, bien sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos y si, además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones. Clásicamente han sido precisamente las diferencias fenotípicas los marcadores genéticos más utilizados, dada la facilidad con que se puede acceder a las mismas. Pero sus limitaciones son ciertas y los genéticos han invertido esfuerzos importantes para generar y desarrollar marcadores genéticos de validez generalizada.

Así, es posible establecer una primera, y muy sencilla, clasificación de los tipos de marcadores genéticos desde una perspectiva que podemos considerar histórica. Establecemos así tres categorías de marcadores genéticos:

- **Marcadores Morfológicos:** se basan en diferencias fenotípicas fácilmente observables en los individuos. Su evaluación es sencilla y constituyen la medida más directa del fenotipo, pero son marcadores sujetos a fuertes influencias ambientales y su número es limitado.
- **Marcadores Bioquímicos:** se basan en las propiedades de migración de las proteínas, propiedades que permiten separar las diferentes variantes mediante electroforesis y que son detectadas generalmente mediante ensayos bioquímicos específicos. Estos marcadores representan un valioso complemento de la evaluación morfológica pero, al igual que los marcadores morfológicos su número es limitado y, además, reflejan sólo una porción pequeña de la variación existente en el DNA.
- **Marcadores Moleculares:** se basan en la detección de polimorfismos en la secuencia de ADN del núcleo o de los orgánulos. Su utilización y análisis permiten detectar variabilidad en la propia molécula portadora de la información genética. Estos marcadores genéticos presentan unas ventajas muy importantes, ya que su número es potencialmente ilimitado y no están sujetos a influencias ambientales. Además, son una medida objetiva de la variación. Como contrapartida cabe señalar que este tipo de marcadores exigen para su detección un equipamiento técnico más complejo.

Sea cual sea el tipo de marcador genético considerado, éste debe presentar una serie de características. Entre ellas destacamos que los marcadores genéticos para ser útiles deben ser:

- Altamente polimórficos
- Reproducibles
- Codominantes
- Distribuidos de manera uniforme en todo el genoma
- Discriminantes
- No sujetos a influencias ambientales
- De bajo costo
- Fáciles de medir

Los desarrollos metodológicos y tecnológicos generados durante los últimos años en el contexto de la biología molecular y de la genética molecular han permitido hacer accesibles a la mayor parte de los laboratorios, tanto de un punto de vista técnico como económico, distintos tipos de marcadores moleculares que dadas sus características y propiedades se ha convertido en los marcadores de elección en la mayor parte de las aplicaciones.

¿Cuáles son las principales aplicaciones en las que los marcadores moleculares están siendo utilizados? Quizás el principal interés y la principal aplicación de estos marcadores, se deriva de su utilización como marcadores genéticos (son, efectivamente, polimorfismos, en este caso de ADN) en el análisis genético convencional basado en el estudio de la segregación de

marcadores en las descendencias de cruzamiento controlados que permiten ampliar y saturar el mapa genético de los organismos. Debemos recordar que estos mapas genéticos constituyen el primer paso, y son la herramienta esencial, para caracterizar el genoma en su conjunto, y cada gen en particular, de un organismo. Particularizando, podemos decir que resultan una herramienta fundamental para estudios de disección genética, de identificación de QTLs, de clonación posicional, de secuenciación de genomas completos, de comparación de genes y genomas (estudios de sintenia).

Pero los marcadores moleculares encuentran también numerosas aplicaciones específicas entre las cuales, y en el contexto del trabajo que se presenta en esta memoria, resulta conveniente destacar: (1) la identificación y caracterización de genotipos ("pruebas de paternidad" y "medicina forense"), caracterización molecular de microorganismos (microbiología ambiental, detección de microorganismos modificados genéticamente, diagnóstico de enfermedades), caracterización y conservación de recursos genéticos, seguimiento de transgénicos; (2) la mejora genética (etiquetado de genes, selección asistida por marcadores, identificación varietal...); (3) estudios evolutivos, estimación de la variabilidad genética, relaciones filogenéticas, sintenia.

3.2 - TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

Las herramientas y los desarrollos de la biología molecular han puesto a nuestra disposición numerosos métodos y procedimientos experimentales para detectar polimorfismos en el propio material hereditario, en el ADN. Nuestra capacidad para detectar estos polimorfismos es cada vez mayor y día a día se presentan nuevas variantes que bien permiten acceder a los distintos tipos de variación, bien nos permiten aumentar o refinar nuestro nivel de detección. Con el objeto de presentar de manera sencilla una panorámica general de los principales tipos de marcadores moleculares que han sido utilizados en estos últimos años resulta útil considerar una clasificación que toma como punto de partida la disponibilidad o no de información previa sobre el sistema con el que nos proponemos trabajar. Ésta es una consideración fundamental a la hora de iniciar la caracterización de un sistema dado. Tanto en un caso como en otro, es decir, tanto cuando nos disponemos a trabajar con marcadores basados en secuencias de ADN conocidas como con marcadores basados en secuencias de ADN no conocidas, debemos tener en cuenta la naturaleza genética de los marcadores moleculares considerados, que podrán ser "Codominantes", si es posible detectar simultáneamente las distintas variantes, (alelos), que puedan aparecer, o "Dominantes", si sólo podemos detectar la presencia o ausencia de una determinada variante. Teniendo en cuenta ambos criterios podemos establecer una clasificación sencilla de los principales tipos de marcadores moleculares que facilita notablemente su explicación y que se presenta a continuación:

1. Marcadores basados en secuencias de ADN no conocidas

- **Marcadores Codominantes** (Ej.: diferencias de tamaño)
 - RFLPs
- **Marcadores Dominantes** (Ej.: presencia/ausencia)
 - RAPDs
 - AFLPs

2. Marcadores basados en secuencias de ADN conocidas

- **Marcadores Codominantes**
 - Microsatélites
- **Marcadores Dominantes**
 - SCARs
 - SNPs

Se describe a continuación en qué consiste cada uno de estos tipos de marcador molecular comentando brevemente sus principales ventajas e inconvenientes.

3.2.1 - RFLP

El acrónimo deriva de la terminología inglesa: "Restriction Fragment Length Polymorphism". En español se traduce como "Fragmentos de restricción de longitud polimórfica". Son polimorfismos que se producen como consecuencia de mutaciones puntuales que afectan a una secuencia de nucleótidos dada que representa una secuencia diana de un determinado enzima de restricción, o de inserciones o deleciones. Se detectan cuando se digieren los ADNs problema con distintos enzimas de restricción, se lleva a cabo una hibridación tipo Southern con sondas específicas y se analizan los patrones de bandas de hibridación obtenidos.

Son marcadores detectados con una metodología muy bien establecida, robusta, reproducible y transferible (entre laboratorios y grupos de investigación). Son, además, marcadores de tipo codominante que resultan muy informativos, ya que a partir del fenotipo molecular es posible inferir directamente los genotipos (es posible discriminar entre el genotipo homocigoto para cada variante y todos los posibles heterocigotos). Presenta, no obstante, algunos problemas derivados fundamentalmente de la complejidad de la metodología utilizada para su detección (exige trabajar con cantidades importantes de ADN de calidad, llevar a cabo digestiones con enzimas de restricción, electroforesis, transferencias de ácidos nucleicos e hibridaciones. Por su naturaleza codominante han sido marcadores muy utilizados para la construcción de mapas genéticos saturados.

3.2.2 - RAPD

Son fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar (de la terminología inglesa: "Random Amplified Polymorphic DNA fragments). Estos fragmentos, generalmente con un tamaño que oscila entre los 200 y los 2000 pares de nucleótidos, son amplificados en reacciones de PCR utilizando como molde un ADN dado y llevadas a cabo en presencia de un único oligonucleótido. Se originan como consecuencia de la presencia en el ADN de la misma secuencia de nucleótidos (o muy similar), de longitud variable pero generalmente pequeña (aproximadamente 10 nucleótidos), en ambas cadenas sencillas de la molécula de ADN, a la distancia apropiada y en orientaciones opuestas. Esta secuencia representa en cada caso la diana de anillamiento de un oligonucleótido de secuencia particular que es el oligonucleótido utilizado como cebador en cada reacción de PCR. Estas reacciones de PCR se llevan a cabo con temperaturas de anillamiento bajas (dependiendo de la secuencia particular de cada oligonucleótido variará, pero habitualmente entre 25 y 45°C) para permitir el anillamiento de los oligonucleótidos de tamaño ciertamente pequeño que se utilizan como cebadores. La presencia o ausencia de posibles dianas de anillamiento para un oligonucleótido dado determina la amplificación de un determinado fragmento de ADN. Cada tipo de ADN molde genera un patrón de bandas característico con un oligonucleótido particular y resulta factible comparar los patrones de bandas que se generan con muestras de ADN de diferentes individuos.

La metodología utilizada para generar RAPDs tiene las ventajas de la sencillez y el bajo coste de la técnica. Desafortunadamente es una metodología 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 de los equipos utilizados. No obstante, con experiencia y cuidado es posible generar resultados reproducibles y transferibles.

Aunque se trata de marcadores dominantes, lo que limita en parte su potencia como marcador genético en determinadas aplicaciones, lo cierto es que han sido muy utilizados en el análisis inicial de sistemas sobre los que no se dispone de información previa, ya que la metodología permite generar numerosos marcadores en un periodo de tiempo reducido, marcadores que, además, suponen una representación aleatoria del genoma. Han encontrado aplicación muy frecuente en la construcción de mapas genéticos y en el análisis de diversidad genética intrapoblacional.

3.2.3 - AFLP

El acrónimo AFLP deriva de la terminología inglesa "Amplified Fragment Length Polymorphism" (en español puede traducirse como "fragmento amplificado de longitud polimórfica"). Estos marcadores derivan de la amplificación mediante PCR de fragmentos de

ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción que generan fragmentos de restricción y ligados a dos adaptadores específicos de los enzimas de restricción utilizados. Estos adaptadores sirven como dianas de anillamiento de oligonucleótidos específicos diseñados para reconocer la propia diana de cada enzima de restricción y una secuencia corta flanqueante del sitio de restricción. Se diseñan sendas baterías de cebadores sobre la secuencia diana de cada una de los dos enzimas de restricción cada uno de los cuales incluye una variante de una extensión en su extremo 3' de 2 - 4 nucleótidos. Posteriormente, en una única fase de amplificación o en una fase doble de amplificación que incluye una primera amplificación preselectiva y una posterior amplificación selectiva, se llevan a cabo reacciones de PCR con parejas de cebadores que incluyen un oligonucleótido de cada juego (diseñado sobre la secuencia diana de cada enzima) el enzima subdivide la población de fragmentos de PCR generados a partir de la muestra de ADN original digerida con los dos enzimas utilizadas en cada caso y de manera que resulta factible resolver de manera adecuada el patrón de bandas (de fragmentos) que en cada caso se genera.

El método, en última instancia, permite detectar polimorfismos de cambio de nucleótido en la región inmediatamente flanqueante de las dianas de restricción de los enzimas utilizados sobre fragmentos de restricción que presenta en un extremo una diana de restricción para la primera enzima y una diana de restricción para la segunda enzima en el otro, y que tiene un tamaño apropiado para su análisis y resolución en geles de acrilamida convencionales (o mediante electroforesis capilar).

La capacidad que tiene esta metodología para detectar polimorfismos es enorme, permitiendo generar perfiles de incluso varias decenas de marcadores simultáneamente. Presenta, además, una elevada reproducibilidad. Estas dos razones son las que nos han animado a utilizar este tipo de marcador molecular para abordar los objetivos planteados en este estudio. Dado que se han utilizado ampliamente a lo largo del mismo y puesto que ha sido necesario poner a punto el sistema experimental en nuestro caso particular contemplando diversas variables, en la sección de Materiales y Métodos y en la sección de Resultados se realiza una descripción detallada de esta metodología y de estos marcadores moleculares. En cualquier caso, para completar la descripción que en esta sección estamos realizando es conveniente destacar que los marcadores de tipo AFLP, a pesar del elevado coste, son marcadores de amplísima utilización, en particular en estudios de evaluación de diversidad genética, de cartografía genética, e elaboración de perfiles de identificación, de análisis de perfiles de transcripción.

3.2.4 - MICROSATÉLITES

Los microsatélites derivan de regiones del genoma en la que se localizan secuencias cortas de ADN (de 1 a 6 nucleótidos de longitud) repetidas en tándem y flanqueadas por

secuencias adyacentes únicas. Constituyen un tipo particular de marcador de aquellos denominados en inglés "Variable Number of Tandem Repeats" (VNTR) o "repeticiones en tándem en número variable", grupo de marcadores que incluye también a los marcadores denominados "Minisatélites", caracterizados por presentar una secuencia unidad repetida de mayor tamaño (de 10 a 30 nucleótidos). Estos *loci* microsatélite se pueden detectar mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en función de las secuencias de las regiones flanqueantes en 5' y 3' de la unidad repetida, o mediante hibridaciones llevadas a cabo con sondas derivadas de la unidad repetida sobre filtros a los que se han transferido digestiones de ADN llevadas a cabo con enzimas de restricción que digieren en los extremos 5' y 3' de la región que incluye en cada caso un número dado de repeticiones de la secuencia unidad. En el primer caso, las distintas variantes de un locus microsatélite se detectan como polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, que tendrán tamaños diferentes en función del número de copias de unidad que se repite en cada caso. En el segundo caso, las distintas formas alélicas se detectan como polimorfismos en el tamaño de bandas de hibridación.

Estos marcadores presentan las ventajas derivadas de su naturaleza codominante. Por otra parte, la experiencia demuestra que son altamente polimórficos y muy reproducibles, lo que ha determinado su amplísima utilización en muy diversos sistemas en problemas relacionados con el genotipado de individuos, la construcción de mapas genéticos, la evaluación de diversidad genética, la realización de estudios filogenéticos, las pruebas de paternidad, identificación varietal. El problema de los marcadores tipo microsatélite es que precisan de un conocimiento previo importante del sistema de trabajo, ya que es necesario conocer las secuencias flanqueantes de la zona que incluye las repeticiones, bien para diseñar oligonucleótidos específicos, bien para seleccionar las enzimas de restricción cuya utilización pueda resultar informativa.

3.2.5 - SCAR

Los marcadores tipo SCAR (del inglés "Sequence Characterized Amplified Fragment", traducido como "fragmentos amplificados de secuencia conocida") constituyen un tipo particular de marcador molecular que ha encontrado aplicaciones específicas. Son regiones del genoma amplificadas mediante PCR cuya secuencia es determinada *a posteriori*. Generalmente se generan a partir de marcadores de tipo RAPD que son secuenciados, aunque también se pueden obtener a partir de RFLPs o de AFLPs. A partir de la secuencia obtenida se diseñan oligonucleótidos específicos (en el caso de los derivados de RAPDs generalmente se diseñan como una extensión en 3' del oligonucleótido utilizado originalmente para generar los RAPDs) que permiten ya amplificar en condiciones de alta especificidad el marcador molecular (el fragmento de ADN de tipo RAPD) concreto que ha sido seleccionado.

Estos marcadores permiten detectar un único locus y la amplificación es mucho más selectiva y desprovista de las imprecisiones características de los RAPDs. Han encontrado aplicación directa en el contexto del desarrollo de métodos de diagnóstico y de identificación molecular de individuos.

3.2.6 - SNP

Los SNPs son "polimorfismos de cambio de un único nucleótido" (del inglés "Single Nucleotide Polymorphism"). Son, efectivamente, polimorfismos derivados de la sustitución de un nucleótido dado por otro en una posición dada del genoma y que se detectan mediante secuenciación directa de la región de interés del genoma. El acceso a este tipo de polimorfismo representa el nivel máximo de acceso (directo) a la variación al que es posible aspirar a la hora de caracterizar un sistema biológico y las poblaciones de individuos. Se producen con una elevadísima frecuencia, lo que hace posible alcanzar una enorme resolución en el análisis genético siempre y cuando las disponibilidades de infraestructura y la financiación permitan trabajar a gran escala (numerosos *loci* de este tipo y poblaciones de individuos numerosas). Ciertamente es una técnica sofisticada y muy cara que se basa en la secuenciación extensiva del genoma.

Estos marcadores se están utilizando muy ampliamente en estudios de cartografía génica, de análisis de variabilidad genética y de cartografía QTLs ("quantitative trait loci", o "*loci* de variación continua").

4 – VARIACIÓN MOLECULAR Y GENÉTICA DE POBLACIONES

Los hongos han tenido siempre interés para el hombre por razones diversas, desde el reconocimiento de su importancia en determinados problemas de salud humana y animal así como en sanidad vegetal y agricultura por su utilización en la industria alimentaria y biotecnológica hasta la consideración de numerosos sistemas como modelos de investigación básica. Sin embargo, hasta muy recientemente su importancia en muchos de estos procesos no ha sido valorada convenientemente. Por ejemplo, aunque la existencia de infecciones causadas por hongos ha sido reconocida desde los inicios de la medicina, sólo cuando a lo largo de las últimas décadas se han producido aumentos muy significativos de la incidencia de estas infecciones en pacientes inmunodeprimidos se ha comenzado a valorar la relevancia y la importancia de las mismas. Este reconocimiento ha determinado y acentuado nuestro interés por desarrollar herramientas de diagnóstico e identificación más rápidas y precisas, de generar métodos para identificar fuentes de inóculo y de desarrollar posibles estrategias de control y

tratamiento y de caracterizar la variación genética existente en las poblaciones de estos organismos patógenos y de evaluar su potencial evolutivo.

Una situación similar se plantea cuando se considera el problema de la sanidad vegetal y las poblaciones naturales de hongos fitopatógenos. Las pérdidas causadas en la actividad agrícola moderna como consecuencia de las infecciones de distintos tipos de organismos patógenos son muy elevadas, en particular aquellas causadas por hongos patógenos de plantas. Reconocida la incidencia de estas enfermedades y la transcendencia de las mismas, cabe plantearse la necesidad de estudiar los sistemas implicados para tratar de generar métodos de control y tratamiento que minimicen los daños. Y en este contexto la primera evidencia a la que se tiene acceso cuando se inicia la caracterización de los sistemas es la existencia de variación fenotípica y genética tanto en los patógenos como en los huéspedes. Ciertamente, tanto en la naturaleza como en el contexto de las prácticas agrícolas modernas más o menos intensas, las plantas están expuestas a muy numerosas especies de patógenos. Cada especie consiste en realidad en una población de individuos entre los cuales, casi en todos los casos que podamos analizar, existe variación. Debemos considerar al patógeno, entonces, en el nivel de la población, reconociendo la existencia de variación entre los individuos en todos los aspectos, en particular en relación con su capacidad para infectar a su planta huésped. Existen individuos más agresivos e individuos menos agresivos en una población dada del patógeno. Es ésta una característica compleja en la que influyen numerosos factores ambientales y biológicos, pero son éstos últimos, determinados genéticamente, los que podemos aspirar a caracterizar para conocer y manejar el sistema de manera perdurable. Debemos considerar igualmente a la planta huésped como población de individuos que muestran diferencias entre sí en cuanto a su capacidad para defenderse del patógeno. Es decir, en una población dada podemos encontrar plantas más resistentes y plantas más susceptibles a un determinado patógeno. Resulta fundamental, por lo tanto, caracterizar tanto la variación genética existente en las poblaciones del patógeno como la variación existente en las poblaciones de la planta huésped. En relación con el propio patógeno, estas cuestiones resultan fundamentales cuando se intenta entender, por ejemplo, de qué manera se vuelve inefectiva una resistencia frente a un patógeno identificada en una determinada variedad de planta, o cómo las aplicaciones de fungicidas determinan la aparición de resistencias que hacen inútiles determinados agentes químicos de control.

Hasta hace poco más de 20 años el análisis de la variación en las poblaciones naturales de hongos patógenos se centró en el estudio de características de tipo morfológico (diferencias fenotípicas muy evidentes y fácilmente observables) o fisiológicas (requerimientos nutricionales, comportamiento sexual o compatibilidad vegetativa). Con frecuencia el análisis de estas últimas no es tarea sencilla, resultando difícil de valorar, cuantificar y estandarizar. En los últimos años el desarrollo de los métodos moleculares ha permitido generar procedimientos muy robustos y muy reproducibles para acceder directamente a la variación en la propia molécula portadora de la información genética, en los ácidos nucleicos. La detección, cuantificación y análisis de esta variación genética en las poblaciones de hongos está

permitiendo abordar cuestiones fundamentales en la biología de este grupo de organismos. En el contexto de la genética de poblaciones de los hongos patógenos de plantas son cuestiones fundamentales a las que ahora podemos tratar de dar respuesta las siguientes:

- a) ¿Cómo se adaptan las poblaciones del patógeno a las nuevas variedades de plantas cultivadas y a los fungicidas?
- b) ¿En qué medida la migración del inóculo causa o condiciona la diferenciación geográfica de las poblaciones del patógeno?
- c) ¿Qué parte de la población de un patógeno establece una epidemia en un cultivo?
- d) ¿Cuál es la importancia de la reproducción sexual en la producción de la variación genética?
- e) ¿Cuánta variabilidad genética hay en la población y cómo se estructura en la misma?

4.1 - ANÁLISIS EN GENÉTICA DE POBLACIONES

En la Genética de Poblaciones es esencial entender el concepto de población. Según la Real Academia Española, una población, en el sentido ecológico, es "el conjunto de individuos de la misma especie que ocupan una misma área geográfica". Pero se trata de una definición un tanto limitada. Según Xu (2006), existen varias definiciones para población, que se solapan parcialmente (Xu and Mitchell 2003; Mish, 1996). Una población puede ser: 1) un grupo de organismos que habitan una localidad particular; 2) un grupo de organismos que se cruzan y que representa el primer nivel de organización en el cual comienza la especiación; y 3) un grupo de objetos a partir del cual se extraen muestras para realizar medidas estadísticas. La primera definición tiene como base las localidades geográficas y el tamaño y los límites de las poblaciones individuales puedan variar mucho y normalmente son arbitrarias. Esta es la definición usada habitualmente en estudios de hongos y de otros organismos. La segunda definición está más basada en consideraciones de tipo genético y es más restrictiva que las otras dos consideradas. En esta definición una población hace referencia a grupos de individuos que están genéticamente aislados pero que aún son capaces de cruzarse con individuos de otros grupos dentro de la misma especie. Para muchas especies es difícil establecer los límites precisos de los grupos de individuos (en términos de capacidad de cruzamiento entre los individuos). En especies de plantas y animales, se ha determinado que tanto factores de tipo geográfico como ecológico son importantes a la hora de determinar estos límites. Un problema añadido en el caso de las poblaciones de hongos se deriva del hecho de que en más de un 20% de las aproximadamente 80.000 especies de hongos identificadas hasta el momento no se ha descrito ni meiosis ni una fase sexual en su ciclo de vida en condiciones de laboratorio (Hawkesworth *et al.*, 1995). La tercera definición es la más versátil de las tres, pues permite el análisis multidimensional de la distribución de la variación genética dentro de las especies, siendo la definición de población más utilizada. Esta última es muy

utilizada en estudios de epidemiología y de prevención de enfermedades infecciosas, particularmente en la identificación de factores de riesgo entre humanos y de potenciales factores de virulencia en patógenos.

A la hora de llevar a cabo un análisis de genética de poblaciones que permita evaluar la variación genética existente en la misma y obtener información sobre el modo en que ésta se organiza, es posible considerar muy distintos marcadores moleculares, pero la utilidad de unos tipos y otros en cada caso dependerá fundamentalmente del nivel de ploidía de la especie de trabajo y de la existencia o no de reproducción sexual. En las especies haploides se pueden utilizar, y resultan informativos, la mayor parte de los marcadores, ya que cada individuo es portador de una única copia del material genético característico de la especie y cada marcador puede ser analizado como un locus particular con dos alternativas alélicas (presencia o ausencia del marcador). En las especies diploides la situación es diferente y la interpretación del número de *loci* y del número de alelos por locus puede ser muy complicada y, en muchos casos, imposible. En especies con un ciclo sexual evidente, la realización de cruzamientos y el análisis de segregación de los marcadores puede ayudar a determinar en cada caso el número de *loci* y de alelos por locus con los que se está trabajando. En las especies diploides que carecen de ciclo sexual, la interpretación de los perfiles de marcadores moleculares es generalmente muy difícil. De forma general, es posible decir que en las especies diploides los marcadores de tipo co-dominante y de copia única constituyen un buen tipo de marcador para llevar a cabo estudios de tipo poblacional (por ejemplo, los RFLPs que identifican genes de copia única, o SNPs).

No existe un marcador molecular ideal para todos los organismos y para tratar de responder a todas las cuestiones que cabe considerar. Algunos marcadores pueden ser útiles a la hora de diferenciar cepas, separar especies o grupos taxonómicos. Para algunos propósitos, es importante usar marcadores específicos para genes. En otros casos, es interesante usar marcadores en regiones del ADN no codificadores de proteínas, los intrones, pues son regiones neutras del genoma y no afectadas por la presión de selección impuesta por el ambiente. Por otra parte, en un mismo organismo dado, es posible utilizar distintos marcadores para responder a cuestiones diferentes. En el caso concreto de los hongos, los métodos moleculares más utilizados en la identificación de especies e individuos son: los polimorfismos de Proteínas (en Isoenzimas), los cariotipos electroforéticos, RAPDs, RFLPs, microsatélites, AFLPs y secuenciación de ADN (Xu, 2006).

Disponiendo de herramientas para detectar variación genética a nivel molecular en las poblaciones y disponiendo de poblaciones de individuos adecuadas para ello, podemos abordar el problema que nos interesa: detectar y cuantificar la variabilidad genética existente en las mismas y determinar el modo en que esta variabilidad se estructura. Disponemos de aproximaciones analíticas que nos permiten tanto tratar de comprender los patrones de variación natural en las poblaciones como de analizar los posibles mecanismos responsables de generar tales patrones en las mismas. Este análisis conlleva la evaluación de la diversidad

genética que existe en cada población (variación dentro de las poblaciones) en un primer nivel de estudio y, a continuación, la comparación de la situación entre distintas poblaciones para determinar la existencia o no de un nivel, mayor o menor, de estructuración de la variabilidad genética entre poblaciones (variación entre poblaciones).

4.1.1 - ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES

Para llevar a cabo el análisis de la variación genética dentro de la población disponemos de varios tipos de índices que nos permiten estimar, cuantificar y describir la variación genética existente en cada población en particular. Los índices más utilizados son:

1. el número de alelos por locus;
2. la frecuencia de alelos individuales (las frecuencias alélicas) ("p" y "q");
3. la *heterocigosidad observada* (H_o): es el porcentaje observado de heterocigotos en cada locus. La media para todos los *loci* estudiados es la *heterocigosidad media observada*;
4. la *diversidad génica* (H_e): es la heterocigosidad esperada ($H_e = 1 - \sum p_i^2$: donde p_i es la frecuencia del alelo "i"-ésimo en un locus). La media para todos los *loci* estudiados es la *diversidad génica media*;
5. las distancias genéticas medias entre aislados;
6. la diversidad genotípica observada. Una medida de esta diversidad genética observada se calcula como $(1 - \sum p_i^2) N/N-1$, siendo p_i , en este caso, la frecuencia del "i"-ésimo genotipo multilocus. Representa, por lo tanto, la probabilidad de que dos aislados tomados al azar de una población tengan diferente genotipo multilocus;

Uno de los aspectos más discutidos en relación con la variación genética dentro de las poblaciones de hongos tiene que ver con el papel que puede jugar la recombinación en la determinación de los patrones de la variación genética en las poblaciones naturales. Dado que todos los microbios se reproducen asexualmente vía mitosis, es de esperar que todas las poblaciones de especies microbianas muestren evidencias de estructura clonal en la naturaleza (Xu, 2004). La pregunta inmediata entonces tiene que ver con el papel que la recombinación pueda jugar como mecanismo generador de variabilidad genética en la naturaleza. El estudio de las contribuciones relativas de la reproducción asexual y sexual al pool de genes de las poblaciones naturales tiene importancia tanto desde un punto de vista teórico como desde un punto de vista práctico. La selección natural favorece en principio la reproducción asexual, ya que un organismo que se reproduce asexualmente transmite a la descendencia toda su dotación genética (todos sus genes), mientras que un organismo que se reproduce sexualmente pasa a cada uno de sus descendientes sólo la mitad de ellos. Sin embargo, sin la mezcla de genes que se produce como consecuencia de la reproducción sexual, la evolución adaptativa se limita a la acumulación de mutaciones favorables que

ocurren dentro de cada linaje. Mediante la recombinación sexual, las mutaciones favorables que aparecen en linajes diferentes pueden combinarse y ofrecerse a la acción de la selección natural, proporcionando una ventaja en la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Por lo tanto, la dinámica de los genes y de las variantes que se van acumulando en las poblaciones está condicionada de manera fundamental por el tipo de reproducción característico o predominante en cada población natural.

¿Cómo determinar entonces si en una población de individuos se produce reproducción sexual, asexual o ambas? En especies de plantas y animales en general es posible estudiar y determinar el modo reproductivo de cada una desde una perspectiva macroscópica. Pero no es éste el caso en la mayor parte de las especies de microbios. En estos grupos de organismos es necesario utilizar otro tipo de herramientas. Los marcadores moleculares y su análisis a nivel poblacional (genética de poblaciones) proporcionan herramientas y estrategias para evaluar la ocurrencia o no de recombinación en estas poblaciones. En el caso concreto de las poblaciones de hongos, existen diferencias intrínsecas muy notables entre los sistemas genéticos que cabe considerar, bien haploides, bien diploides, lo que establece diferencias en los tipos de pruebas que se pueden utilizar en cada caso con este objeto.

En los organismos haploides cada individuo posee una única serie cromosómica y, por lo tanto, una sola copia de un alelo dado para cada locus en particular. En este grupo de organismos los tests de recombinación que se llevan a cabo se basan en la determinación de la ocurrencia de posibles asociaciones entre alelos de *loci* diferentes. En la práctica, los tests para determinar si una población haploide es panmíctica generalmente suponen la comparación de las asociaciones alélicas observadas con aquéllas que cabría esperar si se cumpliera la hipótesis nula de apareamiento aleatorio. Los tests comúnmente utilizados son tres. El primero consiste en determinar el grado de asociación alélica entre pares de *loci*. El desequilibrio de ligamiento es una medida de la asociación entre alelos de pares de *loci*. La asociación aleatoria entre alelos de *loci* diferentes es un indicador de recombinación entre pares de *loci* en la población. En una población panmíctica, se espera que menos de 5% de los pares de *loci* considerados muestren desequilibrio de ligamiento (es decir, que los valores del recuento genotípico observados sean significativamente diferentes de los esperados si se cumpliera la hipótesis nula). El segundo se basa en la determinación de un índice de asociación general (I_A) entre alelos que tiene en cuenta simultáneamente todos los *loci* analizados. I_A ofrece una medida o estimación generalizada de desequilibrio de ligamiento entre todos los *loci* considerados en un estudio y tiene un valor esperado de cero si no hay asociación entre *loci*. Estos dos métodos toman como hipótesis nula la existencia de panmixia. El tercer método utiliza como hipótesis nula la clonalidad completa y se basa en la detección de incongruencias entre las genealogías que se obtienen cuando se consideran por separado genes diferentes para generar las correspondientes relaciones genealógicas. Si los árboles obtenidos con genes diferentes son congruentes, se asume que estas observaciones proporcionan evidencias fuertes de clonalidad. Por el contrario, si los árboles no son congruentes, se asume que está teniendo lugar recombinación.

En organismos diploides, el análisis de la ocurrencia de clonalidad y recombinación es diferente al llevado a cabo en haploides. En las especies diploides generalmente se utiliza como medida de recombinación la estimación de la asociación entre alelos del mismo locus. Y esta asociación se evalúa determinando si la población está en equilibrio Hardy-Weinberg. Si mediante una prueba de Chi-cuadrado se comprueba que no hay diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las frecuencias esperadas en caso de panmixia, entonces es posible asumir que se están obteniendo evidencias de la ocurrencia de recombinación. Se utiliza también un segundo tipo de análisis, denominado Test de equilibrio genotípico compuesto, similar al test del índice de asociación utilizado en especies haploides.

4.1.2 - ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

Para comparar la variación genética entre poblaciones existen varias estrategias, aplicables unas u otras dependiendo de las cuestiones particulares a las que pretendamos dar respuesta. Una primera aproximación de carácter general se basa en comparar los parámetros descriptivos calculados para cada población. Se trata de los parámetros indicados anteriormente: la diversidad génica, la heterocigosidad, la diversidad genotípica, la frecuencia relativa de *loci* polimórficos, el número medio de alelos por locus y la importancia relativa de la recombinación y de la clonalidad entre poblaciones. El análisis comparativo de estos parámetros puede permitir inferir el modo en el que tienen lugar una serie de procesos evolutivos, como la historia de la población, las frecuencias de mutación, las condiciones ambientales y las presiones selectivas. Posteriormente es posible tratar de determinar posibles asociaciones entre factores biológicos y observaciones y elementos genéticos mediante la aplicación de herramientas estadísticas de carácter general.

Una segunda aproximación se basa en examinar directamente las contribuciones de las subdivisiones de la población en los patrones de la variación genética.

La subdivisión de la población conlleva un efecto de endogamia en términos de exceso de homocigosidad (Wright, 1951; Weir, 1996). Por lo tanto, es posible inferir una subdivisión de la población a partir de la estimación de la posible disminución en la proporción de genotipos heterocigóticos en la misma. Los efectos de la subdivisión de la población se estiman mediante el cálculo de un índice denominado "Índice de Fijación" (F_{ST}), que representa la reducción en heterocigosidad de una población subdividida debido a la deriva genética. Se calcula como:

$$F_{St} = \frac{H_t - H_s}{H_t}$$

donde H_T es la heterocigosidad esperada en la población en su conjunto y H_S es la media de las heterocigosidades esperadas en todas las subpoblaciones. F_{ST} tiene un valor mínimo igual a

cero cuando todas las subpoblaciones consideradas son homogéneas, están en equilibrio Hardy-Weinberg y tienen la misma estructura y, por lo tanto, igual a la de la población global (en este caso $H_S = H_T$). Valores superiores a cero son indicativos de cierto nivel de diferenciación: $0.0 < F_{ST} < 0.05$ supone que no existe ninguna diferenciación entre poblaciones; $0.05 < F_{ST} < 0.15$ indica diferenciación pequeña; $0.15 < F_{ST} < 0.25$ supone una diferenciación moderada y $F_{ST} > 0.25$ indica una diferenciación importante. Detectado un nivel dado de estructuración genética en la población es posible iniciar posteriormente el estudio de las razones y de los procesos que están determinando la existencia de ese grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones.

Los índices utilizados para entender la subdivisión poblacional son: G_{ST} , derivado del F_{ST} pero destinado específicamente al análisis de organismos haploides; R_{ST} , utilizado para marcadores microsatélites; θ es esencialmente igual a F_{ST} excepto que difieren en el proceso de muestreo alélico; N_{ST} , que utiliza diferencias nucleotídicas entre haplotipos (Lynch and Crease, 1990); y Φ_{ST} o AMOVA que es una variación de θ pero que incorpora el análisis de varianza ANOVA (Excoffier *et al.*, 1992).

Una vez evaluada la posible diferenciación entre subpoblaciones es conveniente analizar algunas cuestiones relacionadas, como por ejemplo la cuantificación del flujo genético que se produce entre las mismas. Para analizar el flujo génico se pueden considerar diversos modelos demográficos y las estimaciones del flujo genético que se obtienen dependen del modelo considerado y de factores tales como la naturaleza del marcador molecular, la frecuencia de mutación y el sistema de reproducción del organismo en estudio. El cálculo del flujo génico es realizado a partir del índice F_{ST} y de otros parámetros similares utilizando expresiones matemáticas que son diferentes en organismos haploides y diploides.

4.2 – ESTUDIOS POBLACIONALES EN *B. CINEREA* USANDO MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares se han mostrado tremendamente útiles en el análisis de diversidad genética y en la caracterización y estudio de las poblaciones de individuos, tanto de hongos como de otros seres vivos, debido, entre otros factores, a que hacen posible la detección y cuantificación de la diversidad genética existente en las mismas de manera relativamente sencilla. Su utilización, efectivamente, ha revolucionado en particular el estudio de la genética de poblaciones de hongos en los últimos años.

Existen numerosas técnicas que permiten detectar variabilidad molecular. Unas y otras presentan características distintas, lo que determina que algunas sean más ventajosas para ciertos tipos de análisis y otras para otros. Por ejemplo, las técnicas multilocus, como los RAPDs y los AFLPs, son excelentes a la hora de analizar simultáneamente muchos *loci*

polimórficos, pero pueden presentar problemas de reproducibilidad y también problemas derivados de la presencia de bandas distintas que migran conjuntamente. Las técnicas de análisis de *loci* individuales, como los RFLPs, son muy reproducibles y más precisas e informativas a la hora de estimar parámetros genéticos, pero exigen una inversión de tiempo y esfuerzo mucho más importante que los marcadores citados anteriormente.

La técnica de electroforesis de campo pulsado proporciona una primera herramienta de aproximación al problema del análisis de la variabilidad genética, quizás un tanto "grosera" y con un nivel de resolución no muy elevado, pero útil para caracterizar el cariotipo de genomas pequeños, como es el caso de *B. cinerea*. En el trabajo de Vallejo *et al.*, (1996) se estudiaron cinco cepas de *B. cinerea* y cada una presentó un perfil cariotípico distinto, si bien el tamaño en conjunto del genoma resultaba similar en todas ellas.

Para un análisis más detallado de la variación genética en las poblaciones de *B. cinerea* se han utilizado una gran variedad de técnicas moleculares incluyendo el análisis de marcadores tipo RFLP (Muñoz *et al.*, 2010, Giraud *et al.*, 1997), la detección de elementos transponibles mediante PCR (Muñoz *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009; Levis *et al.*, 1997; Dioloz *et al.*, 1995), la detección de RAPDs (Moyano *et al.*, 2003; Thompson and Latorre, 1999; Kerssies *et al.*, 1997; van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993), la detección de AFLPs (Staats *et al.*, 2007; Moyano *et al.*, 2003), la amplificación de *loci* Microsatélite (Rajaguru *et al.*, 2010; Ajouz *et al.*, 2010; Decognet *et al.*, 2009; Fournier and Giraud, 2008; Karchani-Balma *et al.*, 2008; Isenegger *et al.*, 2008 b; Váczy *et al.*, 2008; Ma and Michailides, 2005; Fournier *et al.*, 2002), la amplificación de *loci* minisatélite (Váczy *et al.*, 2008; Giraud *et al.*, 1998), la electroforesis en campo pulsado (Vallejo *et al.*, 1996) y la secuenciación de ADN de regiones codificantes de los genes (Albertini y Leroux, 2004; Fournier *et al.*, 2003; Albertini *et al.*, 2002).

Los primeros estudios llevados a cabo con marcadores moleculares en *B. cinerea* datan de los primeros años de la década de los 90 analizando marcadores de tipo RAPD. En 1993 van de Vlugt-Bergmans *et al.*, publicaron un trabajo centrado en la caracterización y diferenciación de los individuos de una pequeña colección de aislados de campo (8) 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 aquel mismo trabajo se pudo comprobar que estos marcadores segregaron de forma mendeliana y que no estaban ligados. En un segundo estudio realizado con 29 aislados de campo de *B. cinerea* recogidos dentro y fuera de invernaderos en Holanda, Kerssies *et al.*, (1997) identificaron un total de 70 marcadores y comprobaron que sólo dos de los aislados estudiados resultaron ser idénticos, si bien algunos otros mostraron un nivel de similitud genética elevado. El análisis de agrupamientos que se llevó a cabo permitió detectar tres grupos o "clusters", pero no se detectó ningún patrón de agrupamiento en relación con ningún criterio biológico. En España, Alfonso *et al.*, (2000) 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. Cuando se incluyeron en el análisis diversas cepas procedentes de otros países (Israel, Italia, Holanda) tampoco se observó ninguna diferenciación genética significativa. En un estudio relacionado con este último y basado en el análisis de 44 aislados recogidos en seis invernaderos fue posible comprobar un elevado grado de diversidad genotípica (sólo dos haplotipos fueron encontrados en más de un aislado) y sólo pudo detectarse cierto nivel de agrupamiento en aislados que mostraban las mismas relaciones de resistencia/sensibilidad a una serie de fungicidas (Moyano *et al.*, 2003). En Chile se realizó un trabajo similar con un número reducido de aislados (15) recolectados de varios huéspedes, estudio en el que se encontró también una gran diversidad genotípica, aunque se planteaba, en función de las observaciones realizadas, la existencia de un cierto nivel de agrupamiento según el huésped (Thompson and Latorre, 1999). En esta misma línea apuntan algunos otros trabajos. Por ejemplo, en los Estados Unidos, Yourman *et al.*, (2000), lograron aislar 56 cepas de invernaderos en el estado de Carolina del Sur y en el curso de su caracterización comprobaron que todas eran diferentes, aunque describieron un cierto nivel de agrupamiento en relación con la sensibilidad a fungicidas. En otro trabajo realizado en Chile, Muñoz *et al.*, (2002), recogieron 69 aislados, incluyendo dos que fueron aislados del mismo fruto de kiwi, y comprobaron que todos presentaron diferentes haplotipos, indicando ausencia de linajes clonales, si bien los datos que obtuvieron permitieron detectar cierto nivel de agrupamiento por huésped. Todas estas observaciones indican que la población de *B. cinerea* considerada en su conjunto es genéticamente muy diversa, sin evidencias claras de la existencia de linajes clonales, incluso si se tiene en cuenta el posible efecto de cuello de botella genético que factores como la resistencia a fungicidas puede imponer.

Uno de los estudios más amplios e informativos sobre las poblaciones naturales de *B. cinerea* llevados a cabo hasta el momento es el de Y. Brigoo y colaboradores que han hecho uso de marcadores moleculares de distintos tipos, como marcadores tipo RFLP basados en secuencias de genes conocidos (como el gen codificador de la nitrato reductasa, ATP sintasa, ADP-ATP translocasa, rDNA) o de secuencias desconocidas, marcadores de presencia o ausencia de transposones (*Boty* y *Flipper*) y genes de resistencia a fungicidas. Giraud *et al.*, (1997), utilizaron 16 de estos marcadores e identificaron 134 haplotipos entre los 259 aislados recolectados a partir de vid en Champagne, Francia, representando el haplotipo más frecuente sólo un 5% del total de aislados analizados. Los aislados recolectados de la misma planta siempre resultaron distintos (mostraron haplotipos diferentes) y fue posible identificar hasta cinco haplotipos diferentes entre los aislados recogidos a partir de un mismo fruto. Es interesante destacar que incluso aislados que resultaban ser idénticos en los 16 marcadores analizados, pudieron luego ser diferenciados en función del número y localización de las copias de los elementos transponibles. Todas ellas constituyen evidencias de que existe una gran diversidad genética en las poblaciones de *B. cinerea* y son una indicación de una limitada propagación clonal y de un papel significativo de la recombinación en este organismo. Estos

autores verificaron también una diferencia significativa en frecuencias alélicas entre los aislados tipo transposa (que contienen los elementos transponibles *Boty* y *Flipper*) y vacuma (aislados que no presentan ningún elemento transponible). Detectaron, además, valores bajos de desequilibrio de ligamiento, datos consistentes con una reproducción clonal ciertamente limitada. Giraud *et al.*, (1999) obtuvieron resultados que apuntan en la misma línea al analizar poblaciones de aislados recogidos de distintas especies vegetales cultivadas alrededor de los viñedos. Del análisis conjunto de sus observaciones (Giraud *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1999) estos autores llegan a concluir que existen en realidad dos especies hermanas de *B. cinerea* establecidas en principio en función de la presencia o ausencia de transposones en unos individuos y otros. Estudios posteriores han extendido y modificado estas conclusiones (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Se siguen reconociendo, efectivamente, dos poblaciones, pero éstas no son totalmente coincidentes con las reconocidas anteriormente. Estos nuevos grupos se diferencian de manera inequívoca en función de determinados polimorfismos fijados en una población y no en la otra en dos genes [*Cyp 51* (codificador de la 14 α -demetilasa) y *Bc-hch* (homólogo de *het-c*)] y también en la respuesta al fungicida fenhexamida. Estudios adicionales han demostrado que los dos grupos propuestos (I y II) están aislados reproductivamente (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003).

En el trabajo de Tatiana Giraud (Giraud *et al.*, 1998), un minisatélite fue identificado en un intrón del hongo *B. cinerea* que fue denominado como MSB1. Según la autora, ese fue el segundo minisatélite identificado en hongos y sólo fue encontrado en ese hongo, no apareciendo en ninguno de los géneros próximos a *B. cinerea*, como *Sclerotinia*. En su estudio se comprobó que la estructura MSB1 es peculiar, ya que las variaciones están en el mismo orden físico en todos los individuos y ese orden sigue el árbol más parsimonioso.

En *B. cinerea* fueron identificados nueve locus microsatélites (Fournier *et al.*, 2002). Un estudio realizado por Ma *et al.*, (2005) en 234 aislados de *B. cinerea* colectados de distintos huéspedes, demostró que las cepas no estaban agrupadas según su huésped de origen y que los aislados de *B. cinerea* en California pueden ser mayoritariamente clonales. Váczy *et al.*, (2008), analizaron 5 de estos microsatélites (Bc2, Bc3, Bc5, Bc6 y Bc10) en una población integrada por 109 cepas aisladas en Hungría y pudieron detectar 55 haplotipos microsatélite. Estos autores analizaron los datos obtenidos con el índice de asociación, el test chi-cuadrado y el test phi y concluyeron que la población húngara de *B. cinerea* sufre reproducción sexual. En 2008, Fournier *et al.*, (2008), comprobaron que en la población integrada por los mismos aislados de *B. cinerea* estudiados en su trabajo de 2002, en particular dentro de las poblaciones de tipo II, se produce reproducción sexual. En el trabajo de Isenegger *et al.*, (2008a) los autores estudiaron la diversidad genética y la migración de *B. cinerea* en Bangladesh utilizando 9 marcadores microsatélites y concluyeron que la diversidad genética está concentrada dentro de las poblaciones y que existe poca diferencia entre poblaciones de distintas regiones. En Túnez, la población de *B. cinerea* también fue analizada utilizando los nueve locus microsatélites existentes y los autores concluyeron que la población de este hongo se reproduce mayoritariamente de forma sexual en ese país (Karchani-Balma *et al.*, 2008).

Rajaguru *et al.*, (2010) analizó 9 *loci* microsatélites en cepas de *B. cinerea* aisladas de cuatro géneros de plantas distintos en el sur de Inglaterra. Estos autores concluyeron que las cepas aisladas de fresa eran muy distintas de las cepas aisladas de zarzamora, lo que puede ser una indicación de la reproducción clonal en esa región (aunque quizás, según los propios autores indicaron, las diferencias observadas pudieran ser consecuencia del tamaño del muestreo realizado).

Staats y colaboradores compararon tres marcadores moleculares en relación con su utilidad para diferenciar tres especies de *Botrytis* (*B. elliptica*, *B. tulipae* y *B. cinerea*) (Staats *et al.*, 2007) en un trabajo cuyo objetivo principal era inferir la diversidad genética y el modo de reproducción característico de las poblaciones de las especies *B. tulipae* y *B. elliptica*. Los autores concluyeron que el marcador tipo AFLP es más adecuado y potente a la hora de diferenciar las tres especies y determinaron que *B. elliptica* se reproduce de forma sexual mientras que la reproducción en *B. tulipae* es mayoritariamente de tipo clonal.

En un estudio posterior, Muñoz *et al.*, (2010) compararon poblaciones de cepas de *B. cinerea* recogidas en Argentina con poblaciones de cepas francesas y utilizando marcadores moleculares de tipo RFLP. En este trabajo, utilizando el cálculo de índices *Fst* determinaron la existencia de un grado de diferenciación genética muy elevado entre ambas poblaciones. Es decir, en este caso, el factor geográfico ha impuesto un grado de diferenciación genética muy notable.

En resumen, de forma general es posible concluir que los trabajos llevados a cabo con poblaciones naturales de *B. cinerea* recogidas en diferentes localizaciones geográficas y a partir de diferentes huéspedes indican que las poblaciones presentan niveles de diversidad genética muy notables, y que la mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones, siendo generalmente menor la diferenciación genética entre poblaciones. También en general, es posible decir que ni el factor geográfico ni el factor huésped imponen un nivel de estructuración significativo. Sólo en los casos en los que la barrera geográfica es de carácter mayor, es posible observar diferenciación entre las poblaciones. Finalmente, las evidencias obtenidas en relación con el tipo de reproducción preferente en la naturaleza en las poblaciones de *B. cinerea* sugieren que ambos tipos de reproducción se están produciendo simultáneamente en la mayor parte de los casos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Evaluar la incidencia de *B. cinerea* en los viñedos de las D.O. Ribera del Duero, Rueda, Cigales, Toro y Arribes de Duero y en la zona de Vinos de la Tierra Sierra de Salamanca en la campaña 2007.
- Preparar una colección de aislados de campo de *B. cinerea* recogidos en los viñedos de Castilla y León en el año 2007 que amplie la colección de aislados recogidos en el año 2002.
- Valorar la capacidad de crecimiento saprofítico y la patogenicidad sobre judía de los de una muestra amplia de los aislados de *B. cinerea* recogidos en ambas campañas.
- Evaluar la patogenicidad sobre las variedades tintas Tempranillo, Tinta deToro, Prieto Picudo y Garnacha, y sobre las variedades blancas Verdejo, Albillo Real y Albillo Mayor de una muestra representativa de los aislados recogidos en ambas campañas.
- Estimar el nivel de diversidad genética existente en las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla.
- Caracterizar la presencia y distribución de los transposones *Boty* y *Flipper* en los aislados de *B. cinerea* de Castilla y León.
- Determinar el modo de reproducción de *B. cinerea* en las poblaciones naturales del patógeno en los viñedos de Castilla y León.
- Estudiar y determinar el modo en el que se estructura la diversidad genética en las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León evaluando los posibles efectos del factor geográfico (D.O. donde se realizó el aislamiento), el factor "cepa de vid de origen" y el factor temporal (año de recogida).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 – ORGANISMOS

1.1 – HONGOS

Se utilizaron las siguientes cepas tipo silvestre de *B. cinerea* como control: B05.10, TB05.10, T4, UCA001, UCA156, UCA206, Bd90, *Botrytis aclada*.

La cepa silvestre de referencia utilizada en este trabajo fue la cepa B05.10. Es una cepa haploide obtenida en el laboratorio del Profesor Paul Tudzynski (Wilhelms Universität Münster, Alemania) mediante tratamiento con benomilo (Büttner *et al.*, 1994) (Quidde *et al.*, 1999) a partir de la cepa de campo de referencia SAS56 (Faretra *et al.*, 1988) obtenida de vid. B05.10 es una cepa altamente virulenta en la mayoría de los huéspedes que infecta y tiene la ventaja de ser genéticamente estable. Su genoma ha sido secuenciado y anotado recientemente (Amselem *et al.*, 2011). Debido a su alta eficiencia de transformación, es utilizada en la mayoría de los laboratorios como cepa receptora estándar (Tudzynski y Kokkelink, 2009).

Una segunda cepa silvestre utilizada como referencia en ese trabajo es la cepa T4 (Levis *et al.*, 1997), que fue proporcionada por Caroline Levis, de la Estación de Patología Vegetal del INRA, Francia. La cepa T4 fue aislada de tomate y es menos agresiva cuando infecta la vid (Derckel *et al.*, 1999) y su genoma también ha sido secuenciado y anotado recientemente en paralelo con el genoma de la cepa B05.10 (Amselem *et al.*, 2011). El análisis en paralelo de estas dos cepas de referencia resulta muy interesante porque ambas difieren significativamente en virulencia y el análisis funcional de posibles genes de patogenicidad ha revelado que muestran una variabilidad fisiológica y genética considerable (Tudzynski y Kokkelink, 2009).

Las cepas identificadas como UCA son cepas de *B. cinerea* cedidas amablemente por el Prof. Jesús Cantoral, de la Universidad de Cádiz. La cepa UCA001 fue aislada de fresa (*Fragaria ananassa*) en Cartaya (Huelva) en el año 1998. Las cepas UCA156 y UCA206 son dos cepas monoconidiales, que fueron aisladas de uva (*Vitis vinifera*) en Jerez de la Frontera (Cádiz), en el año 2000.

La cepa Bd90 es una cepa francesa, que se aisló de vid en 1986 en el INRA de Bordeaux, Francia (Reignault *et al.*, 1994).

La cepa utilizada de *Botrytis aclada* es la cepa de referencia de esta especie y se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo, perteneciente a la Universidad de Valencia.

La colección cepas de campo incluye son 40 cepas silvestres recogidas durante el año de 2002 a partir de distintas variedades de vid en viñedos de las Denominaciones de Origen de

Ribera del Duero, Cigales, Toro, Rueda, Arribes y Bierzo de Castilla y León. Estas cepas están indicadas en la Tabla 8 y forman parte de la colección de cepas de *B. cinerea* del grupo de hongos fitopatógenos del CIALE.

En el año 2007 se llevó a cabo un nuevo muestreo, descrito en este trabajo, en viñedos de las mismas Denominaciones de Origen (en muchos casos se visitaron exactamente los mismos viñedos). A partir de los materiales recogidos en el mismo se obtuvieron las cepas de campo sobre las cuales se ha llevado a cabo un análisis fisiológico y genético en este estudio. Se realizaron un total de 86 muestreos en campo y se analizaron 216 racimos de distintas variedades de vid y provenientes de distintas denominaciones de origen. En total se recogieron 446 cepas que aparecen relacionadas en la Tabla 5. De todos los aislados se conserva la cepa madre recuperada inicialmente y se obtuvo un cultivo monospórico sobre el que se han llevado a cabo los estudios descritos en este trabajo.

1.2 – PLANTAS

Las plantas utilizadas en los experimentos de inoculación o aislamiento de *B. cinerea* fueron:

Las plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Riñón fueron cultivadas en los invernaderos del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) con un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. Esta planta fue escogida para realizar los ensayos de infección por la facilidad de manejo en condiciones de invernadero y por la facilidad de su cultivo durante el año. Son plantas que tienen un área foliar suficientemente grande para hacer varias infecciones simultáneamente y tienen un tamaño ideal para realizar las inoculaciones a las dos semanas de edad.

Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Roma, fueron cultivadas y cedidas por los Doctores Pablo García Benavides y José Luis Palomo, del Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia, Salamanca, de la Junta de Castilla y León. Fueron cultivadas en condiciones de invernadero con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 6 semanas.

Las plantas de vid (*Vitis vinifera*) fueron utilizadas en dos ocasiones en este trabajo. Para el aislamiento del hongo se visitaron los viñedos correspondientes y se tomaron muestras de racimos que fueron transportados hasta el laboratorio. Las variedades de vid consideradas para la recogida de muestras fueron: Tempranillo, Verdejo, Tinta de Toro, Malvec, Juan García, Jerez Palomino, Bruñal, Rufete, Malvasía, Gajo Arroba, Maldón, San Jeromo, Cabernet Sauvignon, Albillo, Viura, Sauvignon Blanc, Garnacha, Tempranillo Blanco, Moscatel, Pipajo y Mazuelo. Para los ensayos de infección, se utilizaron hojas de vid de las variedades Tempranillo, Verdejo, Garnacha, Prieto Picudo, Tinta de Toro, Albillo Real, Albillo Mayor.

2 – MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 - HONGOS

2.1.1 - CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO DE *B. CINEREA*

El cultivo de micelio en medio líquido es útil cuando se requiere gran cantidad de micelio sin impurezas (agar, p.e.). Para cultivar *B. cinerea* con este objeto, se utilizó el medio líquido B5, que se prepara con sales Gamborg's B5 (3,17 g/L) (AppliChem GMBH, Germany). El medio B5 esterilizado se suplementó con 10 mM de Sacarosa y 10 mM de KH_2PO_4 pH 6.0. La concentración de esporas inoculadas fue de 5×10^5 esporas/ml. El cultivo del hongo en este medio sintético permite producir micelio con un bajo contenido en polisacáridos.

Los matraces fueron mantenidos en reposo después de la inoculación durante 1 h, para favorecer la sincronización de la germinación y luego fueron trasladados a un agitador orbital e incubados a una temperatura constante de 22°C y a una agitación de 180 rpm normalmente durante 18 horas.

El fosfato potásico funciona como buffer, ya que el crecimiento y metabolismo de los organismos cambian las características del medio. En el caso de *B. cinerea*, se agrega el fosfato potásico también para favorecer la germinación de esporas. El micelio producido fue recogido por centrifugación (3000 rpm durante 5 minutos) y lavado con agua destilada estéril. Después de cada lavado el micelio fue sedimentado por centrifugación. Finalmente el micelio fue recogido con ayuda de una espátula, secado con papel filtro, empaquetado en papel de aluminio, congelado en nitrógeno líquido y conservado en el ultracongelador.

2.1.2 - CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO DE *B. CINEREA*

B. cinerea fue cultivado rutinariamente para su mantenimiento en medio sólido sobre placas de medio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco), por favorecer el crecimiento abundante de micelio. Este medio sólido fue también utilizado en las fases iniciales de este trabajo cuando queríamos aislar *B. cinerea* de las uvas infectadas. Para estimular la esporulación de *B. cinerea* se utilizó medio PDA suplementado con 30% p/v de extracto de hojas de tomate (Benito *et al.*, 1998). El inóculo generalmente consistió en un trozo de agar con micelio derivado de otra placa de cultivo o de una gotita de una suspensión de esporas en agua y las placas se dejaron crecer durante 4 días a 22°C. Cuando el micelio cubrió la placa Petri, ésta se expuso a luz ultravioleta de onda larga (280 - 420 nm) durante 16 horas, lo que favorece la conidiación. Las placas se incubaron de una a dos semanas hasta la producción máxima de conidios.

Para el crecimiento normal de micelio y para la estimación del crecimiento radial fue utilizado el medio de cultivo MEA (Malt Extract Agar, Difco). También fue utilizado el medio MEA para la obtención de cultivos monospóricos derivados de esporas únicas. En este medio las esporas germinan y crecen más lentamente facilitando el aislamiento de una única espora que es posteriormente transferida de forma individualizada a una nueva placa de medio de cultivo.

2.2 - PLANTAS

Las plantas de judía fueron cultivadas en macetas con 3 partes de tierra y 1 parte de vermiculita (Projar, SA). Los tiestos fueron regados un día antes de la siembra. Las plántulas crecieron en el invernadero a una temperatura media de 22°C y humedad relativa de 45% durante dos semanas aproximadamente, cuando fueron utilizadas para realizar el ensayo de infección *in vivo*. Cuando las plantas fueron cultivadas en invierno hubo un suplemento de luz para completar el fotoperiodo de 16 horas.

Las plantas de tomate fueron obtenidas del Centro de Diagnóstico de Castilla y León (Aldearrubia, Salamanca). Fueron cultivadas en vermiculita, previamente esterilizada mediante dos ciclos de autoclave de 60 minutos de duración. Fue añadido fertilizante cada 7 días. Las plantas de tomate se mantuvieron 8 semanas en invernadero, a una temperatura de 22°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y riegos periódicos, hasta su utilización para los ensayos de infección de las hojas.

Las cepas de vid fueron utilizadas tanto para la obtención de muestras para llevar a cabo los aislamientos de cepas de campo del patógeno como para la preparación de material vegetal sano para llevar a cabo las inoculaciones en condiciones controladas de laboratorio. Las primeras fueron cultivadas en condiciones naturales en parcelas comerciales de viñedos de nuestra Comunidad Autónoma. Para los experimentos de inoculación se tomaron hojas de vid de cepas cultivadas y mantenidas en las instalaciones del Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León (Aldearrubia) en condiciones naturales. Un pie de planta de cada una de estas variedades es mantenida en condiciones de campo y durante toda la temporada de desarrollo de las plantas, previa a la recogida de material para las inoculaciones, las cepas no recibieron ningún tratamiento fitosanitario.

3 – MANEJO DE *B. CINEREA*

3.1 – EXTRACCIÓN DE ESPORAS DE *B. CINEREA*

En la obtención de esporas es conveniente utilizar la cámara de flujo laminar para garantizar un ambiente estéril. Para la extracción de esporas se agregaron 10 ml de Tween 20, a una concentración $5 \times 10^{-4}\%$. Tween 20 es el nombre comercial para el principio activo Polisorbato 20, un surfactante muy utilizado para usos domésticos, científicos y farmacéuticos, debido a su baja toxicidad.

Se frotó la superficie de la placa Petri con PDA tomate con un extendedor de vidrio para favorecer la liberación de las esporas. Se recogió la suspensión de esporas con ayuda de una pipeta y se filtró con lana de vidrio, bien utilizando un pequeño embudo, bien utilizando una pipeta Pasteur esterilizada para cada cepa. Las esporas fueron recogidas en un tubo de centrifugación de 50 ml de capacidad. Se centrifugó la suspensión de esporas y se tiró el sobrenadante. Las esporas obtenidas se lavaron 3 veces con agua destilada, centrifugando la suspensión de esporas después de cada lavado a 1000 rpm durante 10 minutos para sedimentar las esporas. Finalmente las esporas fueron resuspendidas en 10 ml de agua destilada.

3.2 – CONSERVACIÓN DE AISLADOS

Para la conservación a largo plazo, las esporas de todos los aislados fueron almacenadas en glicerol 15% en el ultracongelador a -80°C . Las esporas fueron conservadas en frigorífico a 4°C durante una semana para su uso en fresco.

3.3 - OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS

Cuando fue necesario obtener cultivos monospóricos de las cepas madre de *B. cinerea* de interés, se sembraron diluciones apropiadas de las suspensiones correspondientes (bien suspensiones en agua, bien suspensiones en glicerol) en placas de MEA extendiendo convenientemente el volumen utilizado en cada caso con la ayuda de un asa de siembra. En este medio las esporas crecen más despacio y en un periodo de tiempo que puede variar entre 12 y 20 horas es posible identificar esporas únicas germinadas que son transferidas a una nueva placa de forma individualizada con ayuda de una aguja enmangada.

De cada aislado de *B. cinerea* se seleccionaron cuatro esporas germinadas que fueron transferidas a otra placa con medio de cultivo MEA para que se desarrollaran. Antes de que los micelios de las colonias derivadas entrasen en contacto unos con otros se seleccionaron un total de tres colonias de cada cepa (por un criterio fenotípico). Cada uno fue transferido a una placa con PDA tomate sobre la que se desarrolló cada micelio en una placa individual. Luego se procedió a recoger esporas, tal como se describe en el apartado 3.1. Cada lote de esporas así recogido constituyen el cultivo monospórico sobre el que se ha trabajado en este estudio y fueron numeradas de 200 hasta 650 para los aislados de 2007 (los aislados de la colección recogidos previamente -en la campaña de 2002- habían recibido los números de 1 a 199).

3.4 - RECUENTO DE ESPORAS

El recuento de esporas se llevó a cabo con la ayuda de una cámara *Thoma* en la que se depositaron las esporas en diluciones apropiadas (generalmente 1:100 y 1:10 del lote original) en agua destilada. La concentración de esporas fue calculada teniendo en cuenta las características de la cámara utilizada, las repeticiones y el factor de dilución aplicado.

4 – PURIFICACIÓN DE AISLADOS DE CAMPO

Para la purificación de los aislados de campo, se utilizaron placas Petri con medio de cultivo PDA. Sobre una placa dada se depositaron tres o cuatro bayas de un racimo y la placa fue incubada a temperatura ambiente durante varios días (el periodo de tiempo fue variable dependiendo de las muestras, pero generalmente no se superaron las dos semanas de incubación). Durante este tiempo se llevó a cabo un seguimiento diario de las placas y de los microorganismos que sobre ellas se iban desarrollando a partir de los frutos. Se observó en particular el crecimiento de hongos, prestando especial atención a las colonias que presentaban un aspecto similar al de las colonias de *B. cinerea*. Estas colonias en particular fueron transferidas de forma individualizada a placas frescas de PDA transfiriendo un pedacito de agar con micelio del borde de crecimiento de la colonia, tratando de evitar la transferencia conjunta de varias colonias que pudieran desarrollarse y llegar a confluir en la placa original. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente permitiendo el desarrollo de las colonias. A partir del borde de crecimiento de la colonia se realizó una nueva transferencia de un pedacito de agar con micelio a una nueva placa. El proceso se repitió al menos 2 veces (y cuando fue necesario, más) hasta obtener sobre la placa de cultivo una colonia de aspecto uniforme y que respondiera visualmente a las características morfológicas de *B. cinerea*. Esta última placa fue incubada durante un periodo de tiempo ya más prolongado, permitiendo su esporulación. Las

esporas fueron recolectadas y almacenadas en glicerol al 15% en el ultracongelador. El aislado así recogido y conservado constituye la cepa madre de cada aislado en particular. El procedimiento se presenta de forma gráfica en la Figura 6.

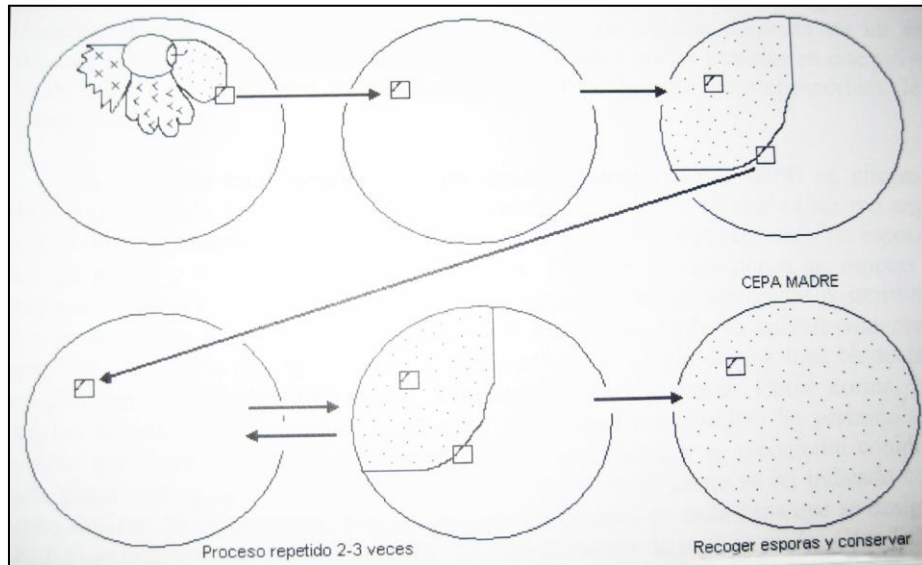


Figura 6. Purificación de *B. cinerea* (tomado de Tello, 2006).

A partir de las esporas de cada cepa madre se obtuvieron cultivos monospóricos siguiendo los procedimientos indicados en la sección anterior y que fueron almacenados también en glicerol al 15% a -80°C .

5 - CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

5.1 – ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO

Para evaluar el crecimiento saprofítico de los distintos aislados se estimó el diámetro de la colonia sobre medio de cultivo MEA a las 72 horas. Para realizar el ensayo en primer lugar se depositó una gotita de la suspensión de esporas (conservada bien en agua en el frigorífico, bien en glicerol en el ultracongelador) de cada aislado analizado (cultivo monospórico) en el centro de una placa de MEA. La placa se incubó a 22°C hasta que la colonia casi alcanzó el borde de crecimiento de la placa (en la situación ideal el borde de la colonia debe distar aproximadamente 0,5-1,0 cm del borde de la placa). A partir del borde de crecimiento de la colonia se prepararon los discos de agar con micelio que constituyeron los inóculos en los ensayos de inoculación. Estos fueron producidos con la ayuda de la base de una punta de pipeta (100 μL) y tienen un diámetro de 0,5 cm. Para cada muestra se sembraron 3 placas de medio MEA para tener un número de medidas estadísticamente apropiado.

Las placas se dejaron crecer a 22 °C durante 3 - 4 días desde de la inoculación. En cada placa se midieron 2 diámetros perpendiculares cuyos valores fueron registrados para su posterior análisis.

5.2 – ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTAS

La agresividad de los distintos aislados de *B. cinerea* sobre las diferentes especies y variedades de plantas consideradas en este trabajo fue evaluada estimando el diámetro medio de lesión necrótica producida a distintos tiempos desde la inoculación (diferente dependiendo de la especie vegetal). Las inoculaciones se llevaron a cabo sobre hojas cortadas de tomate y de vid (variedad Tempranillo, Tinta de Toro, Garnacha, Prieto Picudo, Verdejo, Albillo Real y Albillo Mayor) y sobre plantas intactas en el caso de judía.

5.2.1 - PREPARACIÓN DE LOS DISCOS

Las inoculaciones fueron llevadas a cabo utilizando como inóculo discos de agar con micelio preparados de acuerdo con la descripción realizada en el apartado 5.1. Siempre que fue posible, se trató de evaluar el crecimiento saprofito y la agresividad de los distintos aislados simultáneamente, utilizando discos de agar con micelio preparados a partir de las mismas placas de medio MEA originales. Se colocaron cinco discos por hoja y se utilizaron dos hojas para cada aislado analizado.

5.2.2 - PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL E INOCULACIÓN

Las semillas de judía fueron sembradas 2 semanas antes del ensayo de infección. En el momento de su utilización la judía tenía 2 hojas cotiledonares completamente desarrolladas. No se realizó ningún tipo de desinfección foliar.

En el caso de las plantas de vid y tomate, las hojas fueron cortadas e insertadas por el peciolo en bloques de material inerte y absorbente de floristería previamente saturado en agua y los bloques colocados sobre placas Petri con agua. Esta estructura se colocó en bandejas de plástico en cuya base se colocaron láminas de papel absorbente humedecido y una rejilla que permitiera una separación entre el papel húmedo y las hojas inoculadas.

Las inoculaciones se realizaron colocando los discos de agar sobre la superficie de las hojas con ayuda de una aguja enmangada. En el caso de las hojas de judía se colocaron cinco

discos por hoja y se utilizaron dos hojas para cada aislado analizado. En el caso de vid se colocaron cinco discos por hoja y se utilizó una hoja por aislado. Y en el ensayo de tomate se colocó un disco en cada foliolo y se utilizó una hoja por aislado, que tenía cinco foliolos.

Para alcanzar las condiciones más favorables para la infección del patógeno y por obtener resultados reproducibles en los ensayos de infección, las plantas inoculadas fueron colocadas en cajas que contenían agua y que fueron cerradas herméticamente. Las cajas que contenían las hojas cortadas e inoculadas de tomate y de vid fueron selladas con papel de plástico. En ambos casos el objetivo es mantener condiciones de alta humedad relativa en el interior (>95%). Estas condiciones, junto con la incubación a una temperatura de 22°C, favorecen la infección de *B. cinerea* y permiten obtener resultados reproducibles en los ensayos de inoculación.

5.2.3 - LECTURA DEL ENSAYO

Se realizó la lectura del diámetro de lesión necrótica a las 63 horas después de la inoculación de la planta en el caso de judía y tomate y a las 93 horas después de la inoculación en el caso de la vid. Transcurridos estos tiempos se midieron dos diámetros perpendiculares para obtener una estimación del diámetro de cada lesión. Para cada aislado se calculó el diámetro medio de lesión producido en las 5 - 10 lesiones.

5.2.4 - TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

A los datos resultantes del ensayo de infección en planta y crecimiento saprofítico se aplicó una estadística básica descriptiva que permitió calcular los parámetros: media, desviación típica y error estándar de la media. El software utilizado fue el SPSS v. 17.0 (*Statistical Product and Service Solution*). En los análisis de estimación de la capacidad de crecimiento saprofítico y de agresividad sobre judía se establecieron clases fenotípicas de aislados. Para determinar si el factor cepa ejercía algún tipo de influencia sobre cada una de estas variables se llevó a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Para determinar si existían diferencias significativas entre las clases establecidas se aplicó el Test de Tukey.

6 – EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1 - ADN GENÓMICO DE *B. CINEREA*

Para la extracción de ADN genómico de *B. cinerea* se utilizó el micelio derivado de esporas (cultivo monospórico) cultivadas en medio líquido Gamborg's B5 y almacenado a -80°C.

Las distintas muestras de ADN genómico iban a ser utilizadas tanto para el análisis de AFLPs como para distintas aplicaciones estándar basadas en PCR. Dado el volumen de muestras a considerar en este trabajo y teniendo en cuenta que para estas aplicaciones iba a ser necesario un ADN genómico con un grado de pureza y calidad importante decidimos hacer uso de un método de extracción rápido basado en la utilización de columnas de purificación. Se utilizó concretamente el kit EZNA (*Plant DNA Kit*) suministrado por la casa comercial Omega Biotek, USA, siguiendo los procedimientos indicados por el protocolo que facilita la casa comercial y que acompaña el kit. Las muestras de ADN, una vez extraídas, fueron conservadas en tubos Eppendorf a -80°C en el ultracongelador.

7 – AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1989) fue utilizada en diferentes fases de este trabajo para obtener las distintas amplificaciones de ADN que fueron posteriormente visualizadas mediante electroforesis. La Tabla 1 presenta la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Para comprobar que los distintos aislados de campo obtenidos en este trabajo pertenecen a la especie *B. cinerea* se aplicó un método de diagnóstico molecular basado en el trabajo de Rigotti *et al.*, (2002). Estos autores han generado un marcador molecular tipo SCAR, amplificado con los oligonucleótidos SCAR 1 y SCAR 2 (su secuencia se presenta en la Tabla 1) secuencia que ha demostrado ser específica de los aislados de la especie *B. cinerea*. El uso de estos dos cebadores permite amplificar una banda de 0,7-kb (750-bp) sólo en cepas de *B. cinerea*. Los autores concluyeron en su trabajo que este procedimiento es un instrumento muy útil en la diagnosis de este hongo en plantas de fresa sin síntomas y posibilita la detección de infección y sitios de latencia mejorando así la epidemiología de este patógeno en condiciones de campo.

Las condiciones del perfil de PCR utilizado para la amplificación de este SCAR fueron las siguientes, siguiendo las recomendaciones de los autores: 1 ciclo a 94°C durante 1 minuto, 40 ciclos con una fase inicial de desnaturalización a una temperatura de 94°C durante 30

segundos, una fase de anillamiento de los oligos a una temperatura de 58°C durante 30 segundos y por último una fase de extensión a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, el perfil incluye un ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

También la PCR fue utilizada en los experimentos de detección de transposones, en los cuales con la ayuda de los pares de cebadores *Boty* F4 y *Boty* R4, por una parte, y *Flipper* F300 y *Flipper* F1560, por otra, fue posible amplificar, cuando estuvieron presentes, los elementos transponibles *Boty* (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper* (Levis *et al.*, 1997), respectivamente.

Las reacciones siguieron los procedimientos descritos por Ma *et al.*, (2005). Para la amplificación del fragmento *Flipper*, las condiciones de la PCR fueron: un ciclo de 94°C durante 1 minuto, 40 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, y un ciclo final de 72°C durante 10 minutos. Para la amplificación del fragmento *Boty*, las condiciones de la PCR fueron las mismas que las condiciones para la amplificación del fragmento *Flipper*, exceptuando que la temperatura de anillamiento utilizada fue de 68°C.

La PCR también fue utilizada para amplificar el ADN genómico extraído para su utilización según el protocolo del kit para AFLP (Applied Biosystems), que será discutido con más detalle en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligo	Secuencia
Oligo SCAR IDBC - 1	5' - AGC TCG AGA GAG ATC TCT GA - 3'
Oligo SCAR IDBC - 2	5'- CTG CAA TGT TCT GCG TGG AA - 3'
Oligo <i>Boty</i> – <i>Boty</i> F4	5'- CAG CTG CAG TAT ACT GGG GGA - 3'
Oligo <i>Boty</i> – <i>Boty</i> R4	5'- GGT GCT CAA AGT GTT ACG GGA G - 3'
Oligo <i>Flipper</i> – F300	5'- GCA CAA AAC CTA CAG AAG A - 3'
Oligo <i>Flipper</i> – F1550	5'- ATT CGT TTC TTG GAC TGT A - 3'

8 – ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa en cubetas horizontales, donde fueron sumergidos en el tampón de electroforesis. La concentración de agarosa en los geles varió entre 0,7% y 1,5% (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos que fueran analizados, siendo las concentraciones de agarosa más elevadas utilizadas para resolver fragmentos de ADN de menor tamaño y las concentraciones menores para resolver fragmentos de mayor tamaño.

Para seguir el estado de la electroforesis se mezcló el ADN amplificado con tampón de carga de electroforesis (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilen cianol FF 0,25% p/v, Ficoll tipo 400 15% p/v) en proporción 5/1 (v/v). De esta forma se pudo seguir el ADN por las posiciones relativas de los colorantes del frente, que migran con un tamaño de ADN conocido. Las concentraciones y tamaños de los fragmentos fueron estimados por comparación con muestras patrón de tamaños conocidos que se incluían en los geles (marcador de tamaños de 1kb ladder de Biotools).

Para la preparación del gel se disolvió la agarosa en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y para el desarrollo de la electroforesis se sumergió el gel de agarosa en TAE 1X. Para revelar las bandas en el gel de agarosa, se sumergió el gel en TAE 1X con una concentración final de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 15 minutos. El bromuro de etidio es conocido por intercalarse entre el ADN y por su característica de emitir luz cuando iluminado con luz UV (260 o 360 nm) y así permitir la visualización del ADN.

La electroforesis también fue utilizada con algunas modificaciones en el análisis de AFLP. El gel utilizado para resolver los fragmentos de ADN en este caso fue el gel de poliacrilamida, debido a que la resolución de fragmentos de tamaños muy pequeños es mucho mejor en ese material. Los geles de acrilamida son conocidos por su propiedad de resolver fragmentos pequeños de ADN (25-700 bp) y por su elevada capacidad de resolución de tamaños.

Se siguieron las recomendaciones de la casa comercial (Applied Biosystems) para la realización de la electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 310 (Applied Biosystems, 2007). Todas las operaciones realizadas en ese equipo tales como: el cargamento del polímero, la inyección de la muestra hasta su separación, detección y la generación de datos, son procesos automáticos, sin la necesidad de intervención del técnico responsable por el análisis.

9 – OBTENCIÓN DE AFLPS

Para la obtención de los perfiles de marcadores moleculares tipo AFLP se siguieron los procedimientos generales descritos por el equipo de investigación que describió esta metodología (Vos *et al.*, 1995). La empresa Applied Biosystems ha adaptado y optimizado los protocolos y los reactivos para la detección de AFLPs comercializando un módulo central de un kit básico que se utiliza con distintas variantes de un módulo accesorio sobre muestras de ADN derivadas de genomas de distinta complejidad. En el caso del sistema cuyo estudio se propone en este trabajo, el genoma de un hongo con un tamaño de genoma de aproximadamente 38 Mb (Amselem *et al.*, 2011), la casa comercial recomienda la utilización del kit utilizado para genomas de plantas que hace uso del módulo central y de una serie de oligonucleótidos *EcoRI* con una extensión de sólo 2 nucleótidos adicionales en el extremo 3'.

Describimos a continuación las características y condiciones concretas de los protocolos utilizados incluyendo las modificaciones introducidas por los técnicos del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) en colaboración con investigadores del Departamento de Genética de la Universidad de León.

9.1 - DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE ADAPTADORES A LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Las muestras de ADN genómico utilizadas en este análisis fueron obtenidas siguiendo los procedimientos descritos en la sección 6.1.

Para la digestión del ADN genómico se utilizaron dos enzimas de restricción, una de corte frecuente (*MseI*; 5'-T↓TAA-3') (New England Biolabs. IZASA, Barcelona, España) y otra de corte menos frecuente (*EcoRI*; 5'-G↓AATTC-3') (Roche Diagnostic España, Barcelona, España). Simultáneamente a la digestión con las enzimas de restricción se llevó a cabo la ligación de dos tipos de adaptadores, con extremos cohesivos para los extremos generados por las enzimas *MseI* y *EcoRI*, respectivamente, en presencia de una enzima ligasa. La enzima ligasa utilizada fue la T4 DNA ligasa de alta concentración (New England Biolabs. IZASA, Barcelona, España).

La estructura del adaptador *EcoRI* es:

5-CTCGTAGACTGCGTACC

ATCTGACGCATGGTTAA-5

La estructura del adaptador *MseI* es:

5-GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT-5

Estas reacciones de restricción-ligación se llevaron a cabo utilizando en cada caso 50 ng de ADN genómico en un volumen total de 10 µl de reacción. Las reacciones se prepararon dispensando alícuotas de una "Mezcla Madre" preparada para un total de 10 reacciones en tubos de reacción en los que previamente se habían dispensado 50 ng de ADN genómico. A lo largo de todo el proceso se trabajó por lotes de 10 muestras de ADN genómico.

Efectivamente, es recomendable preparar la "Mezcla Madre" de reacción para 10 muestras de ADN. Para evitar desajustes debidos a pequeños errores de pipeteo se preparó en todos los casos la "Mezcla Madre" en un volumen suficiente para preparar 11 reacciones, descartando el volumen sobrante una vez dispensadas las 10 alícuotas correspondientes a las 10 muestras analizadas en cada lote. Así se preparó la "Mezcla Madre" que en cada caso contenía:

- 11 µl Tampón 10X ADN ligasa de T4 (500 mM Tris-HCl (pH7,8); 100 mM MgCl₂; 100 mM dithiothreitol; 10 mM ATP; 250 µg/ml BSA)
- 11 µl de NaCl (0,5 M)
- 5,5 µl de BSA (1 mg/ml)
- 10 µl adaptador *EcoRI* (20 U/ µl)
- 10 µl adaptador *MseI* (10 U/ µl)
- 1 µl mezcla enzimática (1,1 µl Tampón (10X) ADN ligasa de T4, 1,1 µl NaCl (0,5M), 0,55 µl BSA (1mg/ml), 1,1 µl *MseI* (10 U/ µl), 2,75 µl *EcoRI* (20 U/ µl), 1,1 µl ADN ligasa de T4 (10 U/ µl) y 3,3 µl ddH₂O)
- 5,5 µl de ADN (10 ng/ µl)

Antes de preparar la "Mezcla Madre" los adaptadores se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos en el termociclador. A continuación se preparó la "Mezcla Madre" y se dispensaron alícuotas de 4,85 µl en cada tubo de reacción que contenía un volumen de 5,5 µl de ADN (55 ng).

Los tubos así preparados se incubaron durante 2 horas a 37°C y posteriormente las reacciones de restricción-ligación fueron diluidas añadiendo 189 µl de ddH₂O milli-Q.

9.2 - AMPLIFICACIÓN PRE-SELECTIVA

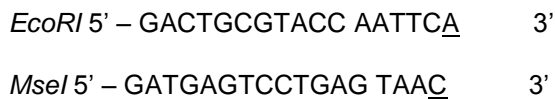
La reacción de restricción - ligación genera tres tipos de fragmentos de ADN: aquellos que tienen en ambos extremos adaptadores *EcoRI* (si derivan de fragmentos *EcoRI-EcoRI*), aquellos que tienen en ambos extremos adaptadores *MseI* (si se trataba de fragmentos *MseI-*

MseI) o bien un adaptador *EcoRI* en un extremo y un adaptador *MseI* en el otro (si deriva de un fragmento *EcoRI-MseI*). Es este último tipo de fragmento el que es susceptible de amplificación en la metodología de detección de AFLPs.

Para la reacción de amplificación pre-selectiva se utilizó la mezcla comercial de cebadores de amplificación preselectiva (AFLP^{II} Preselective primer Mix GU, Applied Biosystems). Los cebadores utilizados en esta amplificación preselectiva tienen la siguiente estructura:

	CORE	ENZ	EXT	
<i>EcoRI</i> 5'	GACTGCGTACC	AATTC	X	3'
<i>MseI</i> 5'	GATGAGTCCTGAG	TAA	X	3'

Como vemos, éstos constan de tres partes. Incluyen en su extremo 5' una secuencia denominada "CORE" característica de cada oligonucleótido. A continuación incluyen una secuencia (ENZ) de 5 o de 3 nucleótidos específica de la enzima (*EcoRI* -AATTC- o *MseI* TAA, respectivamente) y finalmente, en el extremo 3' del oligonucleótido, una extensión (EXT) de un nucleótido (X). Es posible considerar distintos oligonucleótidos en la mezcla de amplificación preselectiva en función de la extensión particular que se incorpore en el extremo 3' de cada oligonucleótido (hasta 16 - 4 x 4- combinaciones posibles). La mezcla comercial de cebadores utilizada en este trabajo para la amplificación preselectiva incluía los siguientes oligonucleótidos:



Para llevar a cabo la reacción de amplificación preselectiva se depositaron 4 µl del producto de la reacción de restricción-ligación diluida en un tubo de 0,2 ml. A esta muestra de ADN se adicionaron 1 µl de la mezcla de cebadores de amplificación preselectiva y 15 µl de la mezcla de reacción comercial (AFLP Amplification Core Mix Module mezcla de dNTPs, *Taq* polimerasa y tampón de amplificación. Applied Biosystems). La mezcla fue entonces sometida al siguiente perfil de PCR: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido de 20 ciclos con 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 2 minutos a 72°C y un último ciclo de elongación durante 30 minutos a 60°C. Luego se mantuvo a 4°C hasta la amplificación selectiva.

Una vez realizada la amplificación preselectiva, esta fue verificada analizando 10 µl de la reacción mediante electroforesis en un gel agarosa al 1,5%. Si la reacción progresó satisfactoriamente debe observarse un rastro de productos de amplificación en la zona del gel correspondiente a los fragmentos de tamaño de 100 hasta 500 bp.

9.3 - AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Para llevar a cabo la amplificación selectiva en primer lugar se diluyó el producto resultante de la amplificación preselección mezclando 10 µl de esta amplificación con 190 µl de ddH₂O. En cada reacción de amplificación selectiva se utilizó posteriormente 3 µl de esta dilución. En cada reacción se incluyó, la combinación de oligonucleótidos selectivos elegida. Estos cebadores selectivos presentan la misma secuencia que los oligonucleótidos preselección respectivos en las regiones correspondientes a la secuencia CORE, a la secuencia ENZ y al primer nucleótido de la extensión, e incluyen cada uno de ellos una extensión dada. Los oligonucleótidos *EcoRI* fueron los oligonucleótidos marcados con el fluorocromo FAM (Applied Biosystems). En nuestro sistema se utilizó el oligonucleótido *EcoRI* marcado con una extensión adicional -C en su extremo 3'. Los oligonucleótidos *MseI* incluyeron extensiones en el extremo 3' bien de 2 nucleótidos (combinaciones -CC, -GG, -AA, -TT) (primera serie de reacciones para poner a punto el sistema), bien de 1 nucleótidos (combinaciones -C, -G, -A, -T) (segunda serie de reacciones de puesta a punto y el conjunto de reacciones finalmente llevada a cabo con todas las muestras de ADN). La Tabla 2 presenta la secuencia concreta de todos los oligonucleótidos utilizados.

Las reacciones de amplificación selectiva se llevaron a cabo en volúmenes finales de 20 µl que incluían 3 µl de la reacción de pre-amplificación diluida, 1 µl de oligonucleótido *EcoRI* marcado con FAM 1 µM, 1 µl oligonucleótido *MseI* 5 µM y 15 µl de la mezcla de reacción comercial (AFLP Amplification Core Mix Module mezcla de dNTPs, *Taq* polimerasa y tampón de amplificación Applied Biosystems). El perfil de PCR aplicado en esta amplificación selectiva consistió en: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C “touch-down” y 2 minutos a 72°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 2 minutos a 72°C; y un último ciclo de elongación de 30 minutos a 60°C. Finalmente la reacción se mantuvo a 4°C hasta que fue retirada del termociclador.

Los oligonucleótidos selectivos de AFLP consisten de tres partes, una secuencia principal (CORE), una secuencia específica de la enzima (ENZ) y una extensión selectiva (EXT). Abajo está la ilustración para los oligonucleótidos *EcoRI* y *MseI* con dos nucleótidos selectivos (siendo los nucleótidos selectivos mostrados como NN):

CORE	ENZ	EXT
<i>EcoRI</i> 5' - GACTGCGTACC	AATTC	AN – 3'
<i>MseI</i> 5' – GATGAGTCCTGAG	TAA	CNN – 3'

Tabla 2. Oligonucleótidos selectivos utilizados en el análisis de AFLPs.

Oligonucleótido EcoRI	
Oligo AFLP – EcoRI+AC	5' – GACTGCGTACCAA TTC AC – 3'
Oligonucleótidos Msel	
Oligo AFLP – Msel +CCC	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CCC – 3'
Oligo AFLP – Msel +CGG	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CGG – 3'
Oligo AFLP – Msel +CAA	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CAA – 3'
Oligo AFLP – Msel +CTT	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CTT – 3'
Oligo AFLP – Msel +CC	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CC – 3'
Oligo AFLP – Msel +CG	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CG – 3'
Oligo AFLP – Msel +CA	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CA – 3'
Oligo AFLP – Msel +CT	5' – GATGAGTCCTGAG TAA CT – 3'

9.4 - SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS EN GEL DESNATURALIZANTE DE POLIACRILAMIDA

Una vez completada la reacción de amplificación selectiva en cada caso, los productos generados fueron separados y analizados en un Analizador Genético modelo ABI Prism 310 siguiendo los procedimientos y las recomendaciones de la casa comercial que manufactura y distribuye el equipo y los reactivos utilizados en este trabajo. Para ello, 2 µL de la reacción de amplificación fueron mezclados con 12 µL de formamida y con 0,5 µL de marcador de tamaño (Size Standard GeneScan-500 LIZ GU Applied Biosystems) y el volumen total fue depositado en un pocillo de una placa de 98 pocillos. La mezcla fue desnaturizada mediante calentamiento a 95°C durante 3-5 minutos y posteriormente inyectada en el secuenciador ABI Prism 310 para su análisis.

El marcador de tamaño utilizado (GeneScan-500) consiste en una mezcla de fragmentos de ADN de doble cadena en cada uno de los cuales sólo una de las dos cadenas sencillas está marcada con un colorante que detecta el lector del ABI Prism. En condiciones desnaturizantes, aunque las dos cadenas derivadas de cada tipo de fragmento se separan en la electroforesis y pueden migrar de distinta manera, sólo una de ellas será detectada. En estas condiciones el marcador de tamaño GeneScan-500 proporciona una estimación muy precisa de

tamaños de fragmentos entre los 50 y los 500 nucleótidos, herramienta absolutamente esencial para determinar los tamaños de los fragmentos de PCR que conforman los electroferogramas generados automáticamente por el sistema.

10 – ANÁLISIS DE DATOS

10.1 - ANÁLISIS DE GELES

Los marcadores moleculares tipo AFLP fueron analizados por el analizador genético de Applied Biosystems, ABI Prism 310 (User Reference Guide), que resuelve los productos de amplificación de las reacciones de AFLP mediante una electroforesis capilar y el resultado es procesado por el programa GeneScan.

En este sistema, después de que las muestras fueron amplificadas se adicionó el marcador de tamaño (size standard) a cada una de ellas, y éstas fueron cargadas en el equipo de electroforesis ABI Prism para la separación electroforética y la detección de fluorescencia. El análisis de las muestras está totalmente automatizado en este equipo desde el momento que cada placa con 96 muestras es colocada dispuesta en el equipo y el análisis iniciado. El analizador ABI permite una operación continuada, sin la necesidad de estar presente, durante la carga del polímero, la inyección de la muestra, la separación de las bandas, la detección de los fragmentos que se van resolviendo con un lector láser y la generación de datos.

El equipo monitoriza el paso de los fragmentos amplificados y portadores oligonucleótidos selectivos marcados en 5' FAM en uno de sus extremos y emite fluorescencia cuando los fragmentos son excitados por el rayo láser. Esta emisión de fluorescencia es detectada por el equipo ABI, que va generando los electroferogramas de forma automatizada. Cuando la electroforesis se termina, el equipo agrupa los datos de cada muestra y los almacena en un electroferograma en formato *.fsa*, una extensión del formato FASTA en el banco de datos. Los fragmentos de menor peso molecular son analizados primeramente, ya que migran más rápidamente en el gel electroforético, y los fragmentos de mayor peso molecular van quedando retrasados en función de su tamaño.

10.2 - GENEMAPPER Y CONSTRUCCIÓN DE MATRICES

Para el análisis de los datos fue utilizado el programa GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems), que reconoce los electroferogramas con el formato *.fsa* generados por el programa GeneScan y que puede identificar los fragmentos de ADN de las muestras de AFLP con precisión y reproducibilidad.

GeneMapper es un programa que procesa la reacción generada en cada muestra, constituida como un “electroferograma de AFLP” o “perfil”, en el cual cada amplicón es registrado como un “pico” caracterizado por su movilidad (convertida en tamaño y medido en pares de bases, “bp”) e intensidad (medido como unidad relativa de fluorescencia, “rfu”). El paso final del análisis es convertir un gran número de perfiles de AFLP, que reflejan los resultados de las reacciones de AFLP llevadas a cabo en muchas muestras, en una matriz binaria, donde la presencia o ausencia de cada amplicón es registrada para cada muestra.

El programa GeneMapper incluye algunas características de interés, como la posibilidad de generar paneles, que recogen toda la colección de marcadores para un conjunto de muestras dado. Permite, además, visualizar con distintos colores los picos de los electroferogramas. Este programa también tiene algoritmos que permiten identificar rápidamente y con precisión los picos polimórficos y los picos comunes entre las muestras. También contiene banderas de calidad, que identifican si una muestra tiene una baja calidad.

La tecnología GeneScan mejora la precisión del proceso de genotipado, pero su precisión no es absoluta y muchos factores que afectan a la calidad de las reacciones de restricción y de amplificación o a la propia migración de fragmentos en los capilares del equipo de electroforesis pueden afectar el registro del tamaño de un amplicón. Consecuentemente, es necesario tener en cuenta que distintos factores pueden determinar variaciones experimentales de los tamaños registrados que no responden a la realidad y que complican el análisis. Asimismo, cabe destacar que distintos fragmentos de ADN pueden tener el mismo tamaño (homoplasia de tamaño – Vekemans *et al.*, 2002). Todo ello hace estrictamente necesario llevar a cabo una verificación y un registro de la presencia o ausencia de cada amplicón de forma manual por parte del usuario. Esta fase, denominada "puntuación" (scoring) fue llevada a cabo en nuestro caso por dos personas.

En la publicación de Bonin *et al.* (2005), existen instrucciones para escoger los mejores marcadores y también sobre los parámetros de puntuación. En la publicación de Wooten and Tolley-Jordan (2009) se pueden apreciar distintos ejemplos de electroferogramas de calidad y también de electroferogramas con errores, cuya consideración ayuda a identificar los electroferogramas que no han salido bien y que deben ser descartarlos.

El uso de procedimientos de puntuación automáticos puede resultar en parcialidad de la técnica que debilita el poder y la fiabilidad de otros análisis (Arrigo *et al.*, 2009). Por eso, para que el programa GeneMapper identifique bien a todos los marcadores, hay que ajustar los parámetros de puntuación del programa. Según Rinehart (2004), el programa GeneMapper, no soporta el análisis de fragmentos tipo AFLP, pues los algoritmos de detección de picos son optimizados para detectar tartamudeo (stutter) en muestras de marcadores tipo SSR (microsatélites). Por esta razón, los usuarios de AFLP tienen que ajustar los parámetros de análisis. Estos son: medición del tamaño del fragmento (fragment sizing), nombramiento de alelo (allele calling) y el formato de la matriz de salida, o resultante (output), para ser compatible con otros programas de análisis filogenéticos.

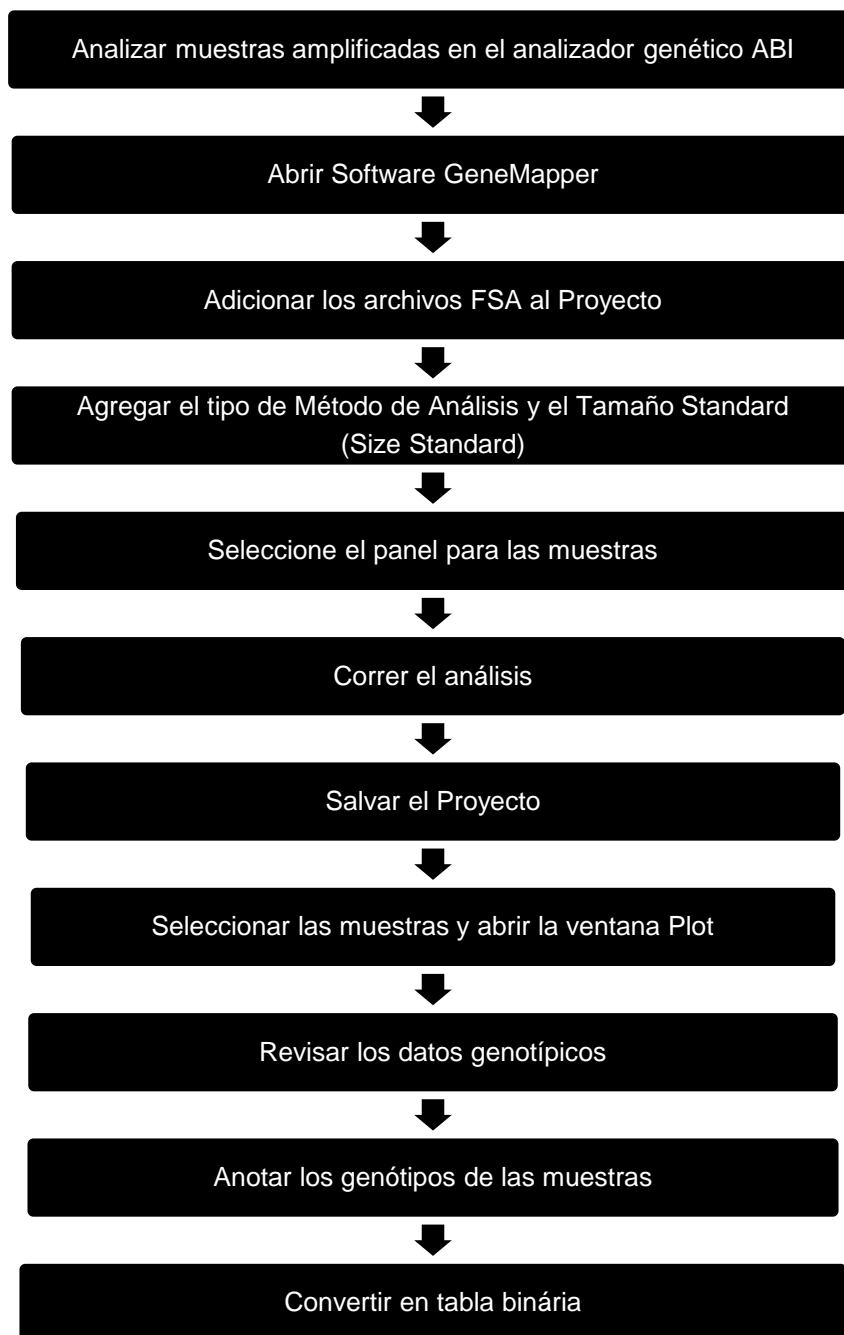
El ajuste de los parámetros del programa conduce a matrices de datos cuyo análisis permite recuperar el verdadero árbol filogenético. Los parámetros que deben ser corregidos son: el límite requerido para la altura del pico (para que el pico sea considerado presente); la longitud mínima de un fragmento, en el que un marcador es puntuado e incluido como un carácter en la matriz y la anchura de un marcador en pares de base (bp) (Holland *et al.*, 2008).

En nuestro análisis se siguió el protocolo de Rinehart (2004). Primeramente se realizó una caracterización semi-automática de los fragmentos AFLP usando el programa GeneMapper. Posteriormente se convirtió la matriz resultante (output) en una matriz binaria mediante un macro desarrollado por ese autor. Finalmente, a partir de la tabla binaria abierta se contrastaron los picos seleccionados con los electroferogramas en el programa GeneMapper.

Los parámetros utilizados para detectar picos en GeneMapper fueron: picos en un rango de 50 a 500 bp, con un mínimo de fluorescencia de 100 rfu.

A continuación se presenta una gráfica con el flujo de trabajo que hay que seguir para obtener el análisis en GeneMapper.

Debido a que los marcadores moleculares tipo AFLP tienen un carácter dominante, fue analizado la presencia o ausencia de bandas, indicando la presencia como "1" y la ausencia como "0".



10.3 - EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Para llevar a cabo este análisis, la matriz obtenida con el programa GeneMapper fue remodelada teniendo en cuenta las frecuencias de los marcadores estudiados. Según Bentley *et al.*, 2008, es necesario que la matriz utilizada para los análisis incluya únicamente marcadores cuya frecuencia oscile entre el 5% < f < 95%. Esta reducción de los marcadores analizados determina que el impacto de la homoplasia sea menor (Caballero *et al.*, 2008). La frecuencia de cada marcador fue calculada con el programa Excel manejando la tabla binaria original y la eliminación de los marcadores con frecuencias inferiores a 0,05% o superiores a 0,95% fue realizada manualmente. Para calcular la frecuencia alélica de cada marcador, teniendo en cuenta que trabajamos con individuos haploides y que se trata de marcadores dominantes, se utilizó la siguiente fórmula:

$$f = \frac{\text{número de individuos en los que el marcador está presente}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de individuos}}$$

Para el análisis de marcadores dominantes, como es el caso de los AFLP, existen dos filosofías alternativas, según Bonin *et al.*, (2007). Una primera aproximación se basa en el estudio directo de la presencia/ausencia de bandas y su objeto es analizar el patrón de bandas presentes o ausentes en cada individuo y entonces comparar los patrones entre individuos. En este caso se hace uso de procedimientos de análisis que consideran diversos índices o coeficientes de similitud que permiten estimar la distancia genética entre individuos. Una segunda aproximación se basa en la estimación de las frecuencias alélicas de los distintos marcadores en la población. Esta última es una aproximación orientada al análisis de la población en su conjunto. Cuando se trabaja con marcadores dominantes, debemos recordar, que las frecuencias alélicas sólo pueden ser calculadas asumiendo determinadas condiciones previas sobre las características de la población y su modo de reproducción. En nuestro trabajo se han tenido en cuenta ambas aproximaciones.

10.3.1 - ESTIMACIÓN DE LAS RELACIONES GENÉTICAS ENTRE INDIVIDUOS

10.3.1.1 - COEFICIENTES DE SIMILITUD GENÉTICA

Una vez generada la matriz binaria definitiva, ésta fue utilizada para estimar los coeficientes de similitud entre individuos. Los principales coeficientes de similitud utilizados son Jaccard, Dice y Simple-matching. Los coeficientes de Jaccard y Dice consideran que sólo la presencia de bandas (compartidas entre cada dos individuos) contribuyen a la similitud, ignorando las ausencias compartidas. La diferencia entre ambos coeficientes reside en el

hecho de que Dice pondera de forma más importante la contribución de las bandas presentes compartidas. Este coeficiente tiende a enfatizar la similitud entre individuos, más que la disimilitud. Por su parte, el coeficiente Simple-matching maximiza la cantidad de información dada por los perfiles de AFLP ya que considera tanto las ausencias de bandas como las presencias de bandas como contribuyentes a la similitud entre individuos. Este coeficiente puede no ser adecuado cuando son frecuentes las bandas homoplásicas, ya que da la misma importancia a la doble ausencia de banda y a la doble presencia de banda (Bonin *et al.*, 2007). Nuestro análisis fue realizado utilizando el coeficiente de similitud de Dice, siguiendo las recomendaciones de por Bentley *et al.*, 2008. Este coeficiente, además, es el que en nuestras manos generó un coeficiente de correlación cofenética (r) mejor.

El coeficiente de similitud Dice fue calculado con el software NTSyS. Con este mismo software se construyó la matriz de similitudes genéticas entre cada dos aislados en todas las combinaciones posibles.

10.3.1.2 - MÉTODOS DE AGRUPAMIENTO Y MÉTODOS DE ORDENACIÓN

Sobre la matriz de similitudes genéticas se aplicaron distintos métodos de Clasificación (Análisis de Cluster o Clustering) y de Ordenación (Análisis de Coordenadas Principales). Inicialmente se consideraron distintas matrices de similitud genética obtenidas con los distintos coeficientes de similitud indicados. Una vez elegido el coeficiente de Dice para nuestros análisis, con la matriz de similitud derivada se llevó a cabo un análisis de agrupamiento de tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) (van Droogenbroeck *et al.*, 2002) con ayuda del programa NTSyS-pc 2.11W (Rohlf, 2002) que permitió generar el dendrograma correspondiente y que muestra las relaciones de similitud genética entre todos los individuos analizados.

Como método de validación interna de los resultados obtenidos y para comprobar la bondad de los resultados obtenidos se construyó la matriz cofenética que fue generada con los valores cofenéticos derivados de la matriz de distancias de Mantel (Mantel, 1967). Se calculó el valor del coeficiente de correlación cofenética " r " y la significancia del mismo fue determinada a partir de 5.000 permutaciones. Valores de " r " próximos a 1 indican un muy buen ajuste entre la matriz de similitud original y el dendrograma.

Con los datos originales se llevó a cabo también un análisis de componentes principales para visualizar fácilmente las posibles relaciones entre individuos. Este análisis fue realizado también con el software NTSyS-pc 2.11W (Rohlf, 2002) haciendo uso de los algoritmos Dcenter y Eigen.

10.3.2 - PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

Obtenido el dendrograma generado haciendo uso del coeficiente de similitud de Dice, se determinó la presencia de aislados- clones, que fueron considerados como tales cuando mostraban un coeficiente de similitud superior a 97%. A partir de la matriz binaria original se generó entonces una matriz derivada "corregida de clones", en la que se mantuvo un único representante de cada tipo clonal (recogía, por lo tanto, el total de haplotipos identificados en la población analizada). Con ambas tablas se llevaron a cabo en paralelo todos los cálculos de estimación de diversidad genética y de determinación de estructura genética de las poblaciones.

El porcentaje de *loci* polimórficos (PLP), el número de alelos observados (na), el número efectivo de alelos (ne) y la diversidad génica de Nei (h), fueron calculados con el programa PopGene (Yeh *et al.*, 1999), asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg ($Fis=0$). La diversidad genética total de la población (Ht) y el coeficiente de diferenciación génica (Gst) fueron calculados usando los estadísticos de diversidad génica de Nei (Chen *et al.*, 2009) también con ayuda del programa PopGene. El índice de diversidad génica de Nei, h (Nei 1973; Nei 1978) está basado en el cálculo de las frecuencias alélicas y requiere suposiciones adicionales para su utilización, pero asumidas éstas produce estimaciones que son directamente comparables con estimaciones de marcadores codominantes. El número de haplotipos (N) fue obtenido directamente a partir de la tabla "corregida de clones".

Los índices "diversidad genotípica" (G), "diversidad genotípica normalizada" (G/N) y la "fracción clonal" (FC) fueron calculados manualmente siguiendo las siguientes fórmulas:

$$G = \frac{1}{fx \left(\frac{x}{n}\right)^2}$$

donde " x " representa el número de veces que un clon se repite y " n " es el número de aislados analizados.

Para calcular el valor de la diversidad genotípica normalizada se dividió el valor de diversidad genotípica (G) por el número de haplotipos (N).

Para determinar la fracción clonal (FC) se utilizó la siguiente fórmula:

$$FC = 1 - \left(\frac{\text{número de genótipos únicos}}{\text{número total de genótipos}} \right) \times 100$$

10.3.3 – ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

Antes de iniciar los análisis encaminados a determinar la existencia o no de estructuración genética en la población es necesario considerar si se dispone de poblaciones con un tamaño apropiado para llevar a cabo los estudios propuestos (que permitan generar datos estadísticamente válidos). Para alcanzar el mismo nivel de fiabilidad, en comparación con el nivel de fiabilidad considerado con marcadores codominantes, en la estimación de los parámetros poblacionales en estudios basados en AFLPs se requiere un número que oscila entre 2 y 10 veces más individuos por población que cuando se utilizan, por ejemplo, marcadores de tipo dominante (Lynch and Milligan, 1994; Mariette *et al.*, 2002; Nybom 2004). Nybom (2004) ha registrado que se ha utilizado un promedio de 14,5 muestras o individuos por población en un total de 27 estudios llevados a cabo con AFLPs en plantas (Bonin *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estas orientaciones, en nuestro estudio hemos tratado de utilizar poblaciones integradas por al menos 15 individuos en todos los casos, si bien en algunas poblaciones no ha resultado posible (por ejemplo, en nuestro análisis por variedades de vid de origen de las cepas del patógeno en los casos de las variedades Garnacha, Malvasía y Viura).

Las muestras (aislados del patógeno) analizadas en nuestro estudio fueron divididas en grupos atendiendo a los criterios (A) Geográfico o Denominación de Origen: (1) Arribes, (2) Cigales, (3) Ribera del Duero, (4) Rueda, (5) Sierra de Salamanca y (6) Toro; (B) Variedad de uva a partir de la cual se realizó el aislamiento: (1) Garnacha, (2) Juan García, (3) Malvasía, (4) Rufete, (5) Tempranillo, (6) Tinta de Toro, (7) Verdejo y (8) Viura; y (C) Año de recolección de los aislados: (1) 2002 y (2) 2007. Los análisis fueron realizados tanto con la matriz con clones y la matriz sin clones.

10.3.3.1 - CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN

Para obtener indicación en una primera aproximación de la existencia de diferenciación genética entre poblaciones se llevó a cabo una estimación del "Coeficiente de Diferenciación" G_{ST} , un índice que resulta ser más apropiado para poblaciones de organismos haploides. Su cálculo se basa en la estimación del valor de Heterocigosidad Promedio Esperada entre todas las poblaciones consideradas (H_S) y de Heterocigosidad Total Esperada en la población en su conjunto (H_T). G_{ST} se calcula como $(H_T - H_S) / H_T$ y permite estimar el efecto de reducción de la heterocigosidad de la población como consecuencia de la subdivisión de la población. Todos los índices necesarios para estos cálculos, así como los valores correspondientes de G_{ST} , fueron calculados con ayuda del programa PopGene v.1.32. Un valor de Coeficiente de Diferenciación $G_{ST} = 0$ supone que las poblaciones comparadas forman parte en realidad de una población panmíctica. Valores entre 0 y 0,05 son indicativos de una diferenciación nula, un valor entre 0,05 y 0,15 indica una diferenciación moderada y un valor superior a 0,15 indica una

diferenciación notable. Valores próximos a 1 suponen que las poblaciones están completamente diferenciadas y la ausencia de migración y de flujo genético entre ellas.

10.3.3.2 - SIMILITUD GENÉTICA ENTRE SUBPOBLACIONES

La determinación del valor de la Heterocigosidad en cada subpoblación considerada (atendiendo a cada criterio de subdivisión) permitió calcular la "Identidad Normalizada" entre cada dos subpoblaciones en todas las combinaciones posibles. A partir de estos valores de identidad normalizada se calcularon las "Distancias Genéticas de Nei" entre cada dos subpoblaciones con ayuda del programa Popgene v.1.32. y se construyó la matriz derivada de Distancias Genéticas de Nei entre poblaciones. Con esta matriz, y siguiendo el método de agrupamiento UPGMA, se construyó en cada caso el dendrograma que permite visualizar las relaciones de similitud genética entre subpoblaciones.

Para visualizar de manera sencilla las relaciones de similitud genética entre las subpoblaciones se llevó a cabo un análisis de Coordenadas Principales haciendo uso del programa FAMD.

10.3.3.3 - ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN A PARTIR DE MÉTODOS DE AGRUPAMIENTO BAYESIANOS. PROGRAMA STRUCTURE

Para agrupar los aislados utilizando un método de agrupamiento Bayesiano no espacial de inferencia estadística se llevó a cabo un análisis con el programa Structure v.2.3. Este programa permite deducir la estructura poblacional, identificar distintas poblaciones, asignar individuos a poblaciones e identificar migrantes e individuos mezclados (Pritchard *et al.*, 2000a). Para aplicar este método seguimos el procedimiento desarrollado por Atallah *et al.*, (2010): para cada número de agrupamientos K (K = 1 – 7), definidos como agrupamientos genéticos, fueron realizados 10 reanálisis con un periodo burn-in (reparación de errores) de 10000 generaciones y 10000 simulaciones de la Cadena Markov Monte Carlo (MCMC). Se consideraron tanto condiciones de mezcla de los individuos como de no mezcla. Para encontrar el número real de poblaciones (ΔK) utilizamos el programa online Structure Harvester v. 0.6.5, que indica cuántas poblaciones existen (Evanno *et al.*, 2005).

10.3.3.4 - ANÁLISIS MOLECULAR DE LA VARIANZA (AMOVA)

Para llevar a cabo un análisis detallado de la posible estructura genética de las poblaciones del patógeno que se establecen atendiendo a los distintos criterios se llevó a cabo un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). En este caso se utilizó el coeficiente de similitud simple-matching (Sokal and Michener, 1958), dadas sus propiedades métricas Euclidianas (Excoffier *et al.*, 1992) (Bonin *et al.*, 2007) y la tabla derivada fue analizada con el programa FAMD (Schlüter and Harris, 2006). La diversidad genética total fue cuantificada y fraccionada en diversidad genética "dentro de las poblaciones" y "diversidad genética entre poblaciones".

10.3.3.5 - CORRELACIÓN ENTRE "DISTANCIA GEOGRÁFICA" Y "DISTANCIA GENÉTICA"

Con el objeto de evaluar la existencia de una relación entre distancia genética entre poblaciones y distancia geográfica se llevo a cabo un análisis de correlación entre ambas variables. Para ello se construyó una matriz de distancias genéticas entre cada dos subpoblaciones, estimadas mediante el cálculo de las correspondientes Distancias Genéticas de Nei. Se construyó una segunda matriz, ésta de distancias geográficas entre los centros geográficos de las distintas zonas con distinción de Denominación de Origen o de Vinos de la Tierra consideradas en este trabajo. En cada caso se tomó como centro geográfico una localidad representativa localizada aproximadamente en el centro geográfico de la zona considerada. Las distancias geográficas lineales fueron estimadas con ayuda del programa Google Maps y transformadas utilizando una escala logarítmica. Se construyó con los datos derivados una matriz de logaritmos de distancias geográficas. Con ambas matrices se llevó a cabo un análisis de correlación con el programa Excel.

10.4 - ANÁLISIS DEL MODO DE REPRODUCCIÓN

Para obtener evidencias sobre el modo de reproducción preferente en la poblaciones naturales de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla-León se analizó el desequilibrio de ligamiento (LD) existente en las mismas, asumiendo que valores nulos o muy bajos de LD son indicativos de recombinación y de reproducción sexual en las poblaciones y que valores de LD significativamente distintos de cero son indicativos de poblaciones que se reproducen de forma asexual y en las que se producen y acumulan en mayor o menor medida tipos clonales.

La existencia de LD en las distintas poblaciones consideradas fue evaluada utilizando dos tipos de pruebas diferentes. En primer lugar se estimó el valor del índice de asociación,

" I_A ", y del índice " rd ", cálculos llevados a cabo utilizando el programa Multilocus v.1.3b. En segundo lugar en cada población se llevó a cabo un test de LD de dos *loci* para todas las combinaciones posibles de todos los *loci* considerados tomados de dos en dos.

El índice de asociación (I_A) es una medida tradicional del desequilibrio de ligamiento (Brown *et al.*, 1980, Maynard Smith *et al.*, 1993; Haubold *et al.*, 1998, Agapow y Burt, 2001). El valor de I_A se estima mediante la siguiente fórmula:

$$I_A = \frac{V_o}{V_e} - 1$$

Donde V_o es la varianza observada entre las distancias genéticas detectadas entre cada dos individuos (número de *loci* en los que cada dos aislados difieren) y V_e es la varianza esperada en ausencia de LD (Agapow y Burt, 2001). La hipótesis nula es que la población muestreada sufre recombinación, en cuyo caso I_A debe ser igual a "0". Si el valor I_A es significativamente distinta de cero, entonces la hipótesis nula puede ser rechazada y se asume que los aislados muestreados pueden probablemente proceder de una población con modo de reproducción clonal ($I_A > 0$). Sin embargo, si el valor observado de I_A no es significativamente mayor que "0", los aislados muestreados probablemente derivan de una población con reproducción sexual en la que ocurre recombinación.

El análisis de LD de dos *loci* hace uso de la prueba de chi-cuadrado. En este caso se comparan las frecuencias observadas y esperadas de los cuatro genotipos posibles para todas y cada una de las posibles parejas de *loci* polimórficos que es posible considerar entre todos los *loci* polimórficos analizados en cada población y la hipótesis nula de trabajo es la de existencia de equilibrio de ligamiento. Con ayuda del Programa PopGene se determinaron las parejas de *loci* que mostraban una desviación significativa ($P < 0,05$) de la situación de equilibrio de ligamiento y finalmente se calculó el porcentaje de combinaciones que éstas representaban en el total de combinaciones de *loci* por parejas que es posible establecer. En una población completamente panmíctica se espera que menos de un 5% de las posibles combinaciones de pares de *loci* muestren LD (Xu, 2006).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - INCIDENCIA DE *B. CINEREA* EN LOS VIÑEDOS DE CASTILLA Y LEÓN

La vid constituye un cultivo de enorme relevancia económica en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. *B. cinerea*, el hongo responsable de la “podredumbre gris” es uno de los principales patógenos de la vid en todos los viñedos del mundo, en los viñedos de gran parte del territorio nacional y en la mayor parte de las zonas productoras de nuestra Comunidad Autónoma.

Todos los años, campaña tras campaña, se recogen y destacan noticias relacionadas con la incidencia de *B. cinerea* en nuestros viñedos y se describen pérdidas económicas muy importantes derivadas de la pérdida de entre el 20 y el 50% de la cosecha en aquellos años en los que en las fechas previas a la recogida de los frutos se dan las condiciones climáticas (temperatura moderadas y lluvias abundantes) que favorecen el desarrollo del patógeno, condiciones frecuentes durante el mes de Septiembre en nuestra Comunidad.

Es un problema que preocupa a los viticultores, a la industria vitivinícola en general y a los técnicos de los Consejos Reguladores en particular. Aunque se reconoce la problemática y los viticultores y los técnicos llevan a cabo y aplican medidas preventivas de forma rutinaria, no existen estudios detallados sobre las características fisiológicas y genéticas del patógeno presente en nuestros viñedos ni sobre la organización, comportamiento y dinámica de las poblaciones naturales del patógeno que se desarrollan en nuestras zonas productoras.

Nuestro grupo trabaja desde hace tiempo en la caracterización del patógeno desde un punto de vista molecular utilizando para su análisis y estudio cepas de referencia cultivadas en el laboratorio durante largos periodos de tiempo y obtenidas generalmente a partir de colecciones de cultivos donde fueron depositadas hace mucho tiempo y procedentes de un aislado concreto realizado sobre un huésped particular.

Siendo conscientes de la importancia que tiene a la hora de caracterizar un patosistema trabajar tanto con la planta huésped de interés, es decir, la variedad o variedades concretas con las que se trabaja en un área geográfica particular, y con los aislados autóctonos del patógeno presentes en ese mismo entorno geográfico, nuestro grupo de investigación decidió hace algunos años tratar de recoger aislados de *B. cinerea* a partir de cepas de vid cultivadas en los viñedos de Castilla y León.

Inicialmente se llevó a cabo una recogida de muestras muy limitada durante las campañas 1999, 2001 y 2002. Fruto de los trabajos realizados entonces fue la comprobación de la más que considerable incidencia de *B. cinerea* en nuestros viñedos y la recogida y purificación de una pequeña colección de cepas de campo de *B. cinerea* obtenidas a partir de frutos de vid de algunas variedades representativas de nuestra Comunidad Autónoma y cultivadas en viñedos de las principales Denominaciones de Origen de Castilla y León. Las

cepas obtenidas fueron purificadas en forma de cultivos monospóricos y conservadas en la colección de cepas de hongos fitopatógenos que mantiene y conserva el grupo de Genética de Hongos del Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (Departamento de Microbiología y Genética) de la Universidad de Salamanca.

El trabajo experimental que se resume, presenta y discute en esta memoria de tesis Doctoral fue propuesto originalmente con el propósito de ampliar el estudio llevado a cabo de forma limitada en años anteriores durante una campaña adicional, la correspondiente al año 2007, en la cual se realizarían visitas más numerosas y frecuentes a un mayor número de viñedos y de zonas productoras de la Comunidad.

El objetivo fundamental es ampliar la colección de aislados de *B. cinerea* recogidos de vid en Castilla y León para generar una población en la medida de lo posible representativa de las poblaciones naturales del patógeno en nuestros viñedos y sobre la que llevar a cabo una serie de estudios fisiológicos y genéticos centrados en el análisis de la dinámica poblacional del patógeno en campo.

1.1 - SELECCIÓN DE VIÑEDOS (D.O.) Y VARIEDADES DE VID EN 2007

El presente trabajo fue iniciado en Agosto de 2007 en el marco de un proyecto de investigación financiado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) titulado “Caracterización genética y diversidad de las poblaciones de hongos patógenos de vid en Castilla y León” (Ref. SA-02-C2-1), llevado a cabo en colaboración con el Grupo de Viticultura del ITACyL, dirigido por la Doctora María Teresa Martín Villullas. El grupo de Salamanca asumió la responsabilidad de la caracterización de la dinámica poblacional de las poblaciones naturales de *B. cinerea* en nuestros viñedos.

La primera cuestión que debía ser abordada era la recolección de aislados de campo de *B. cinerea* a partir de distintas variedades de vid y de viñedos ubicados en distintas zonas productoras de nuestra Comunidad. Se seleccionaron cuatro zonas productoras de reconocido prestigio y que disponen de la distinción Denominación de Origen desde hace tiempo. Estas son: Ribera del Duero, Rueda, Cigales y Toro. Además se seleccionaron dos zonas productoras de especial interés para nuestro grupo de investigación dada su localización geográfica en nuestro entorno más próximo, en su mayor parte en nuestra propia provincia. Se trata de las Arribes, zona que ha obtenido el reconocimiento como Denominación de Origen muy recientemente, y la zona de la Sierra de Salamanca, reconocida en la actualidad con la distinción de “Vinos de la Tierra” (Tabla 3).

Tabla 3. Denominaciones de Origen y Zonas Vinos de la Tierra de Castilla y León seleccionadas.

Denominación de Origen
Arribes
Cigales
Ribera del Duero
Rueda
Toro
Zona Vinos de la Tierra de Castilla y León
Sierra de Salamanca

La Figura 7 muestra la localización y la extensión que cubre en la Comunidad Autónoma de Castilla y León cada una de las zonas seleccionadas.

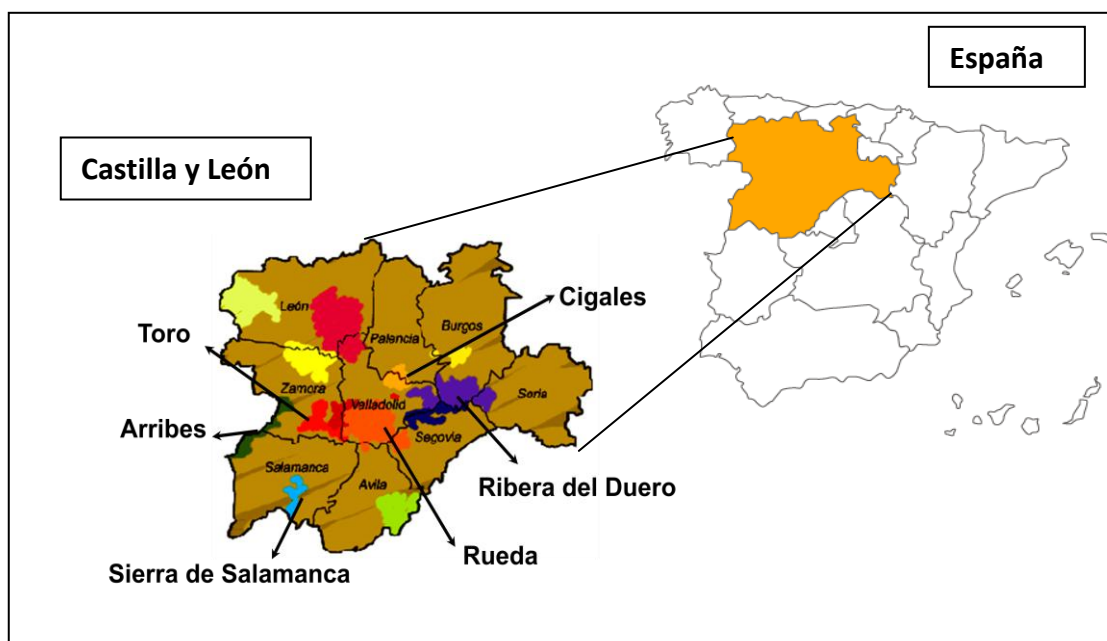


Figura 7. Mapa de la Comunidad Autónoma de Castilla y León que presenta la ubicación y la extensión de las principales zonas productoras de vino indicando aquellas que han sido seleccionadas para realizar el presente trabajo.

En cada región con Denominación de Origen o con distinción Zona Vinos de la Tierra se seleccionaron una serie de viñedos que fueron visitados en repetidas ocasiones desde el 24 de Agosto hasta el 15 de Octubre de 2007 por miembros de nuestro grupo de investigación para recoger muestras de frutos de vid. La Tabla 4 presenta un listado de los municipios donde se encuentran ubicados los viñedos seleccionados y visitados en cada zona productora y en la Figura 8, se puede observar estos municipios en el mapa.

Tabla 4. Municipio al que pertenecen los viñedos visitados dentro de cada zona productora.

Localidad de los viñedos
Arribes
Fermoselle
Aldeadávila de la Ribera
Villarino de los Aires
Pereña de la Ribera
Saucelle
Cigales
Cigales
Dueñas
Ribera del Duero
Valbuena de Duero
Pedrosa de Duero
Aranda de Duero
Roa
Pesquera de Duero
Rueda
Rueda
Toro
Toro
Morales de Toro
San Román de Hornija
Sierra de Salamanca
San Esteban de la Sierra
San Miguel del Robledo
Santibáñez de la Sierra



Figura 8. Foto realizada con la herramienta Google Earth, donde se presentan las localidades de los viñedos.

Puesto que inicialmente nuestro interés principal era recoger una población amplia de aislados de campo de *B. cinerea*, en cada visita a un viñedo en particular se realizó una inspección visual de un buen número de cepas tratando de encontrar racimos con síntomas de podredumbre gris. En aquellos casos en los que fue posible identificar *B. cinerea* sobre los frutos de vid, el racimo completo fue recogido e introducido en una bolsa de plástico de cierre hermético para su transporte al laboratorio. No obstante, en todos los viñedos se recogieron racimos de vid asintomáticos, aparentemente sanos, que fueron introducidos igualmente en bolsas de plástico de cierre hermético para su transporte al laboratorio. A partir de bayas de estos frutos asintomáticos trataríamos posteriormente de aislar posibles cepas de *B. cinerea* presentes en las mismas.

Para la detección y purificación de cepas del patógeno presentes en los materiales vegetales llevados al laboratorio se aplicaron los procedimientos experimentales descritos en la sección de Materiales y Métodos. De manera resumida el proceso seguido es el siguiente.

En aquellos casos en los que fue posible apreciar micelio de *B. cinerea* en la superficie de las bayas del racimo, como por ejemplo en la Figura 9, se tomó una muestra de éste con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas y se depositó en una placa de PDA. La placa se incubó entonces a 22°C realizando un seguimiento visual diario del crecimiento del hongo.



Figura 9. Aspecto de un racimo de vid (variedad Tempranillo) infectado por *B. cinerea*. Fotografía tomada en el viñedo a pie de planta.

En la mayoría de los racimos no se apreció visualmente micelio de *B. cinerea* sobre las bayas (Figura 10A). En estos casos se tomaron tres o cuatro bayas procedentes de un racimo asintomático que se colocaron sobre la superficie de una placa PDA y ésta se incubó a 22°C, realizando igualmente un seguimiento diario de la misma (Figura 10B).

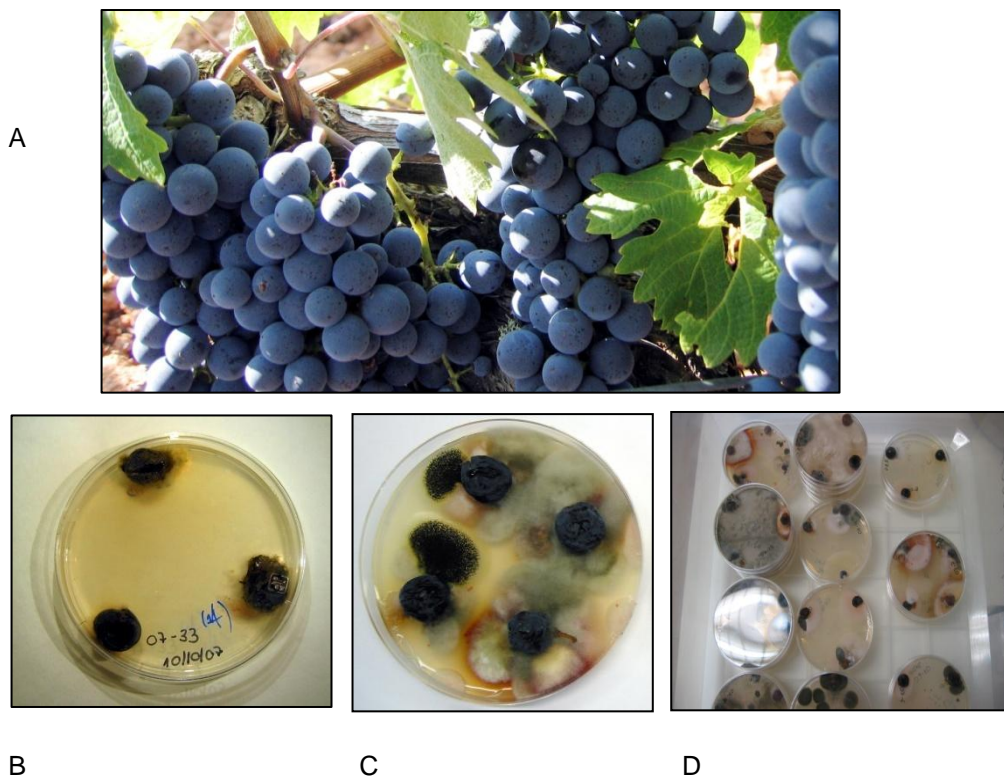


Figura 10. (A) Racimo de vid sin presencia aparente de *B. cinerea*. (B) Bayas procedentes de un racimo asintomático colocadas sobre una placa de PDA. (C) Microorganismos desarrollándose sobre una placa de PDA a partir de bayas de un racimo asintomático. (D) Vista global del desarrollo de microorganismos de las bayas seleccionadas sobre placas de medio de cultivo sintético.

A medida que iban desarrollándose sobre la placa colonias de distintos hongos (Figuras 10C y 10D), a partir del borde de crecimiento de cada una de ellas se transferían a placas nuevas y de manera individualizada pequeños bloques de agar con micelio. Desde un principio nos centramos en aquellas colonias que visualmente parecían corresponder a colonias de *B. cinerea*. De estas placas se llevaba igualmente un seguimiento visual diario. Con frecuencia la primera transferencia implicaba replicar una mezcla de colonias de tipos diferentes. En cuanto se apreciaban colonias en la placa de primera transferencia en las que resultaba factible apreciar e individualizar aislados diferentes, éstos eran transferidos de nuevo a placas frescas.

El proceso se repetía tantas veces como fuera necesario hasta conseguir sobre la placa una colonia de aspecto uniforme que respondiera a las características morfológicas de *B. cinerea* y que no produjera sectores correspondientes a tipos diferentes. A partir de esta placa se recogían esporas que serían luego conservadas en glicerol al 15% a -80°C . Esta cepa así conservada constituye la denominada "cepa madre" de cada uno de los aislados de campo. Todos los procedimientos seguidos para obtener y purificar los aislados de campo se describen en la sección de Materiales y Métodos. Estos aislados, las "cepas madre", constituyen el material de partida de nuestro trabajo.

Aunque todos los aislados recogidos respondían a las características morfológicas de *B. cinerea* (atendiendo al tipo y aspecto de la colonia en placas de medio de cultivo sintético, al aspecto del micelio al microscopio y la morfología de las esporas), no se podía descartar, en primer lugar, que la cepa conservada como cepa madre fuera en realidad una mezcla de varias cepas de *B. cinerea* diferentes, y en segundo, que hubiéramos cometido errores de identificación.

Por esta razón, a partir de cada cepa madre se obtuvieron cultivos monospóricos utilizando los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos. De cada cepa madre se obtuvieron varios cultivos monospóricos y fue seleccionado uno para su conservación. Se permitió que la placa correspondiente esporulara, se recogieron esporas en cada caso y éstas fueron almacenadas en glicerol al 15% y a -80°C. Estos cultivos monospóricos son los cultivos utilizados en este trabajo y es posible asumir un elevado grado de uniformidad genética para cada uno de ellos, puesto que deriva de una única espora.

Para confirmar que los cultivos monospóricos conservados eran realmente aislados de la especie *B. cinerea* utilizamos un método de identificación molecular basado en la detección de un marcador molecular de tipo SCAR específico de la especie *B. cinerea* (Rigotti *et al.*, 2002). Nosotros hemos comprobado la validez del método con anterioridad (Díez, 2004; Tello *et al.*, 2007).

De cada cultivo monospórico purificado en este trabajo se obtuvo micelio mediante el cultivo en medio Gamborg's B5 suplementado con 10 mM sacarosa y 10 mM KH₂PO₄ pH 6.0 de una suspensión de 10⁵ esporas/ml. Se extrajo ADN genómico del micelio de cada cepa utilizando el kit de EZNA. Una vez comprobada la integridad del ADN obtenido en cada caso mediante electroforesis, se utilizaron 10-20 ng de ADN genómico de cada una de las cepas como ADN molde en reacciones de PCR en presencia de los oligonucleótidos SCAR1 IDB-1 y SCAR2 IDB-2 (ver Tabla 1), utilizando las condiciones de PCR descritas en la sección 7 (Amplificación de ADN por PCR) en el capítulo de Materiales y Métodos. El tamaño del fragmento amplificado es de 757 bp.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos con una muestra representativa de aislados, concretamente con los aislados 202, 206, 207, 209, 211, 212, 216, 217 y 222, resultados que confirman que todos ellos pertenecen a la especie *B. cinerea*, pues en las reacciones correspondientes se amplifica el fragmento de 0,75 kb SCAR1 IDB-1 y SCAR2 IDB-2. En la reacción llevada a cabo utilizando como ADN molde ADN de *B. aclada* (carrera C), utilizada como control negativo, no se amplificó el fragmento diagnóstico. Este análisis fue llevado a cabo con ADN genómico de todos los aislados recogidos, obteniendo siempre resultados positivos que permitieron confirmar que todos los aislados analizados en este trabajo y que todos los aislados almacenados en nuestra colección, son aislados de la especie *B. cinerea*.

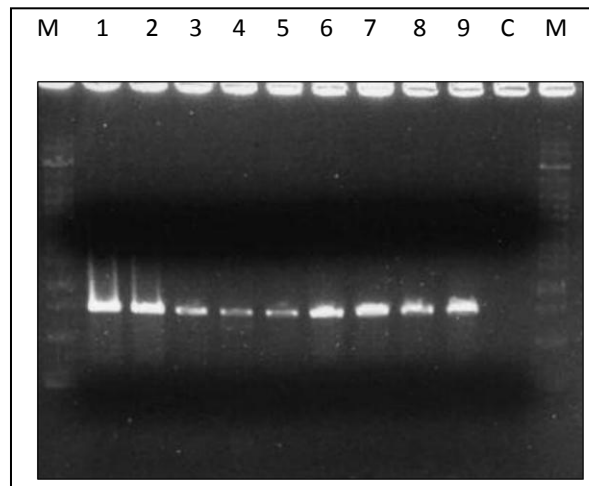


Figura 11. Gel de electroforesis con los productos de amplificación generados en las reacciones de PCR llevadas a cabo con ADN molde obtenido de los aislados de campo de *B. cinerea* 202 (1), 206 (2), 207 (3), 209 (4), 211 (5), 212 (6), 216 (7), 217 (8), 222 (9) y (C) de la cepa de colección de *B. aclada*, utilizando los oligonucleótidos SCAR1 IDB-1 y SCAR2 IDB-2. M – Marcador de tamaño de 1 kb ladder (Biotools).

Fruto del trabajo de recolección realizado durante la campaña 2007 en los viñedos de nuestra Comunidad Autónoma ha sido posible recoger y purificar una colección de aislados integrada por 427 aislados de campo de *B. cinerea*. La Tabla 5 presenta un listado de todos los aislados recogidos y purificados indicando la Denominación de Origen donde se ubica el viñedo visitado en cada caso y la variedad de vid sobre la que se realizó el aislamiento. Para cada aislado incluido en nuestra colección se indica el código alfa-numérico de la cepa madre y el código numérico definitivo para el cultivo monospórico derivado de cada una de aquéllas que ha sido conservado en la colección.

A lo largo de la campaña 2007 se realizaron en total 86 recogidas de muestras de material vegetal en el campo (Código 07-1 a 86 - en la Tabla 5). En la mayoría de los casos se recogieron varios racimos en la misma toma de muestras que fueron tratados de manera independiente para purificar aislados [por ejemplo, 07-42 (1) a (13) indica que en la toma de muestras de número 42 de 2007 se recogieron y analizaron hasta 13 racimos diferentes y de manera individualizada].

En aquellos casos en los que el código del aislado incluye una letra "A", ésta indica que la cepa aislada fue obtenida a partir de un fruto con síntomas de podredumbre a partir del micelio que ya se desarrollaba en el campo sobre las bayas del racimo. Cuando se incluye la letra "B", el aislado correspondiente fue obtenido a partir de bayas asintomáticas en el campo una vez procesadas en el laboratorio.

Tabla 5. Colección de aislados de campo de *B. cinerea* recogidos sobre vid en la campaña de 2007. En amarillo se puede apreciar los aislados seleccionados para el análisis fisiológico y molecular.

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha Recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
a 07-1	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	Tempranillo	202
b 07-1	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	Tempranillo	203
07-2	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	Tempranillo	205
07-3	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	varias	206
07-3	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	varias	207
07-5	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	Tempranillo	209
07-6	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	8/31/2007	Tempranillo	211
07-7	Ribera del Duero	Pedrosa de Duero	8/29/2007	Tempranillo	212
07-9	Toro	San Román de Hornija	8/28/2007	Tinta de Toro	216
07-9	Toro	San Román de Hornija	8/28/2007	Tinta de Toro	217
07-12	Toro	San Román de Hornija	8/28/2007	Tinta de Toro	222
07-12	Toro	San Román de Hornija	8/28/2007	Tinta de Toro	223
07-13	Cigales	Dueñas	8/24/2007	varias	224
07-16	Cigales	Cigales	8/24/2007	varias	227
07-17 A (1)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Tempranillo	228
07-17 B (1)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Tempranillo	229
07-17 A (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Tempranillo	230
a 07-17 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Tempranillo	231
b 07-17 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Tempranillo	232
07-18 A	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Malbec	233
a 07-18 B	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Malbec	234
b 07-18 B	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Malbec	235
07-19 A (1)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	236
07-19 B (1)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	237
07-19 A (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	238
a 07-19 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	239
b 07-19 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	240
07-19 A (3)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	241
a 07-19 B (3)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	242
b 07-19 B (3)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Syrah	243
07-20 A	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Malvasía	244
07-20 B	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Malvasía	245
07-21 A (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Juan García	246
a 07-21 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Juan García	247
b 07-21 B (2)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Juan García	248
07-21 A (3)	Arribes	Fermoselle	10/9/2007	Juan García	249

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospóric
07-22 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Tinta Jeromo	250
07-22 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Tinta Jeromo	251
07-23 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bastardillo	252
07-24 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Jerez Palomino	253
07-24 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Jerez Palomino	254
a 07-25 A (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	255
b 07-25 A (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	256
a 07-25 B (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	257
b 07-25 B (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	258
07-25 A (2)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	259
a 07-25 B (2)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	260
b 07-25 B (2)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	261
07-25 A (3)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	262
07-25 B (3)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Juan García	263
a 07-26 A (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	264
b 07-26 A (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	265
a 07-26 B (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	266
b 07-26 B (1)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	267
07-26 A (2)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	268
07-26 B (2)	Arribes	Villarino	10/9/2007	Bruñal	269
a 07-27 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	270
b 07-27 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	271
c 07-27 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	272
07-27 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	273
07-28 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Rufete	274
a 07-28 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Rufete	275
b 07-28 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Rufete	276
c 07-28 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Rufete	277
07-29 A	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	278
07-29 B	Arribes	Villarino	10/9/2007	Malvasía	279
07-30 A (1)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	280
07-30 B (1)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	281
07-30 A (4)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	282
07-30 B (4)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	283
07-30 A (5)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	284
07-30 B (5)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	285
07-30 A (6)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	286
a 07-30 B (6)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	287

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
b 07-30 B (6)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Juan García	288
07-31 A (1)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	289
07-31 B (1)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	290
07-31 A (2)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	291
a 07-31 B (2)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	292
b 07-31 B (2)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	293
07-31 A (3)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	294
07-31 B (3)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	295
a 07-31 A (4)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	296
b 07-31 A (4)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	297
07-31 B (4)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	298
a 07-31 A (5)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	299
b 07-31 A (5)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	300
07-31 B (5)	Arribes	Aldeadávila	10/9/2007	Tempranillo	301
a 07-32 A (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	302
b 07-32 A (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	303
a 07-32 B (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	304
b 07-32 B (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	305
07-32 A (2)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	306
07-32 B (2)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Gajo Arroba	307
07-33 A (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	308
a 07-33 B (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	309
b 07-33 B (1)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	310
07-33 A (2)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	311
07-33 B (2)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	312
a 07-33 A (3)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	313
b 07-33 A (3)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	314
a 07-33 B (3)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	315
b 07-33 B (3)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	316
c 07-33 B (3)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	317
07-33 A (4)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	318
07-33 B (4)	Arribes	Pereña de la Ribera	10/9/2007	Juan García	319
07-34 B (1)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Maldón	320
07-34 A (2)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Maldón	321
07-34 B (2)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Maldón	322
07-35 A (1)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Malvasía	323
a 07-35 B (1)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Malvasía	324
b 07-35 B (1)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Malvasía	325

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monosporico
07-35 A (2)	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Malvasía	326
a 07-36 A	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Tinta Jeromo	327
b 07-36 A	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Tinta Jeromo	328
a 07-36 B	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Tinta Jeromo	329
b 07-36 B	Arribes	Saucelle	10/9/2007	Tinta Jeromo	330
07-38 A (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	332
a 07-38 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	333
b 07-38 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	334
07-38 A (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	335
07-38 B (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	336
07-38 A (3)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	337
07-38 B (3)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Merlot	338
07-39 A (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	339
a 07-39 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	340
b 07-39 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	341
c 07-39 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	342
d 07-39 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	343
07-39 A (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	344
07-39 B (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Malbec	345
07-40 A	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Pinot Noir	346
07-41 B	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	C. Sauvignon	349
a 07-42 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	350
b 07-42 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	351
c 07-42 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	352
07-42 A (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	353
a 07-42 B (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	354
b 07-42 B (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	355
07-42 A (5)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	356
07-42 B (5)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	357
07-42 B (6)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	358
07-42 B (7)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	359
07-42 A (8)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	360
07-42 B (8)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	361
a 07-42 A (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	362
b 07-42 A (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	363
07-42 B (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	364
07-42 A (10)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	365
a 07-42 B(10)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	366

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monosporico
b 07-42 B(10)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	367
a 07-42 A(12)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	368
b07-42 A(12)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	369
07-42 B(12)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	370
a 07-42 A(13)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	371
b07-42 A(13)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	372
07-42 B (13)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	373
07-43 B	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Petit Verdó	374
07-44 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	375
a 07-44 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	376
b 07-44 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	377
c 07-44 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	378
07-44 B (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	379
a 07-44 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	380
b 07-44 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	381
07-44 A (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	382
a 07-44 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	383
b 07-44 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	384
07-44 A (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	385
a 07-44 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	386
b 07-44 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	387
07-44 A (7)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	388
07-44 B (7)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	389
07-44 A (8)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	390
07-44 B (8)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	391
a 07-44 B (9)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	392
b 07-44 B (9)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	C. Sauvignon	393
07-45 A (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	394
a 07-45 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	395
b 07-45 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	396
07-45 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	397
07-45 B (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	398
a 07-45 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	399
b 07-45 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	400
a 07-45 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	401

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
b 07-45 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	402
07-45 A (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	403
a 07-45 B (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	404
b 07-45 B (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Malbec	405
07-46 A (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	406
07-46 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	407
07-46 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	408
07-46 B (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	409
a 07-46 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	410
b 07-46 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	411
a 07-46 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	412
b 07-46 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	413
c 07-46 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	414
a 07-46 A (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	415
b 07-46 A (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	416
a 07-46 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	417
b 07-46 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	418
07-46 A (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	419
07-46 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	420
07-46 A (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	421
07-46 B (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Albillo	422
07-47 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	423
07-47 B (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	424
a 07-47 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	425
b 07-47 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	426
07-47 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	427
07-47 A (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	428
07-47 B (6)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	429
07-47 A (7)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	430
07-47 B (7)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Tempranillo	431
07-48 A (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	432
07-48 A (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	433
07-48 B (2)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	434
07-48 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	435
07-48 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	436
07-48 A (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	437
a 07-48 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	438
b 07-48 B (4)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	439

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
07-48 A (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	440
a 07-48 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	441
b 07-48 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Viura	442
07-49 A (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	443
07-49 B (1)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	444
07-49 A (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	445
07-49 B (3)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	446
07-49 A (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	447
07-49 B (5)	Ribera del Duero	Roa	10/8/2007	Garnacha	448
07-51 B (1)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	C. Sauvignon	450
07-51 A (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	C. Sauvignon	451
07-51 B (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	C. Sauvignon	452
07-52 A (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	453
07-52 B (2)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	454
07-52 B (3)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	455
a 07-52 A (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	456
b 07-52 A (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	457
a 07-52 B (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	458
b 07-52 B (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	459
c 07-52 B (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	460
d 07-52 B (4)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	461
07-52 B (5)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	462
07-52 A (6)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	463
a 07-52 B (6)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	464
b 07-52 B (6)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	465
07-52 A (7)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	466
07-52 B (7)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	467
a 07-52 A (8)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	468
b 07-52 A (8)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	469
07-52 B (8)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	470
07-52 A (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	471
a 07-52 B (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	472
b 07-52 B (9)	Ribera del Duero	Aranda de Duero	10/8/2007	Tempranillo	473
07-53 A (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	474
07-53 B (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	475
07-53 A (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	476
07-53 B (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	477
07-53 A (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	478

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Termino Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
07-53 B (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Viura	479
07-54 A (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	480
07-54 B (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	481
07-54 B (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	482
07-54 A (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	483
a 07-54 A (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	484
b 07-54 A (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	485
a 07-54 B (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	486
b 07-54 B (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	487
07-54 A (5)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	488
07-54 B (5)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	489
07-54 A (6)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	490
07-54 B (6)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Verdejo	491
07-55 A (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	492
07-55 B (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	493
07-55 A (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	494
07-55 B (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	495
07-55 A (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	496
07-55 B (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	497
07-55 A (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	498
07-55 B (4)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	499
07-55 A (5)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	500
07-55 B (5)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Tempranillo	501
07-56 A (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Sauvignon Blanc	502
07-56 B (1)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Sauvignon Blanc	503
07-56 A (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Sauvignon Blanc	504
07-56 B (2)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Sauvignon Blanc	505
07-56 A (3)	Rueda	Rueda	10/9/2007	Sauvignon Blanc	506
07-57 A (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	507
a 07-57 B (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	508
b 07-57 B (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	509
07-57 A (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	510
07-57 B (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	511
07-57 A (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	512
07-57 B (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	513
07-57 A (4)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	514
07-57 B (4)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	515
07-57 A (5)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	516

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
07-57 B (5)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	517
07-57 A (6)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	518
07-57 B (6)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	519
07-58 A (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	520
07-58 B (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	521
07-58 A (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	522
07-58 B (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	523
07-58 A (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	524
07-58 B (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Garnacha	525
07-59 A (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	526
07-59 B (1)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	527
07-59 A (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	528
07-59 B (2)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	529
07-59 A (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	530
07-59 B (3)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	531
07-59 A (4)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	532
07-59 B (4)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	533
07-59 A (5)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	534
07-59 B (5)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	535
07-59 A (6)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	536
07-59 B (7)	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Malvasía	538
07-60 A	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo	539
07-60 B	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo	540
07-61 A (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	541
07-61 B (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	542
a 07-61 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	543
b 07-61 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	544
a 07-61 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	545
b 07-61 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	546
a 07-61 A (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	547
b 07-61 A (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	548
07-61 B (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Rufete	549
07-62 A (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	550
a 07-62 B (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	551
b 07-62 B (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	552
a 07-62 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	553

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
b 07-62 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	554
07-62 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Tempranillo Blanco	555
a 07-63 A (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	556
b 07-63 A (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	557
07-63 B (1)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	558
a 07-63 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	559
b 07-63 A (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	560
a 07-63 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	561
b 07-63 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	562
c 07-63 B (2)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	563
a 07-63 A (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	564
b 07-63 A (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	565
a 07-63 B (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	566
b 07-63 B (3)	Sierra de Salamanca	San Esteban	10/11/2007	Moscatel	567
a 07-64 A	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Pedro Jiménez	568
b 07-64 A	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Pedro Jiménez	569
a 07-64 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Pedro Jiménez	570
b 07-64 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Pedro Jiménez	571
c 07-64 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Pedro Jiménez	572
07-65 A (1)	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Rufete	573
07-65 A (2)	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Rufete	574
07-65 B (2)	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Rufete	575
a 07-66 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Tempranillo	576
b 07-66 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Tempranillo	577
c 07-66 B	Sierra de Salamanca	San Miguel	10/11/2007	Tempranillo	578
07-67 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	579
a 07-67 B (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	580
b 07-67 B (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	581
a 07-67 B (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	582
b 07-67 B (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	583
a 07-67 A (3)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	584
b 07-67 A (3)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	585
07-67 B (3)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	586
07-67 A (4)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	587

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
a 07-67 B (4)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	588
b 07-67 B (4)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	589
07-67 A (5)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	590
07-67 B (5)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	591
a 07-67 A (6)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	592
b 07-67 A (6)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	593
07-67 B (6)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Tempranillo	594
07-68 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Rufete	595
a 07-68 B (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Rufete	596
b 07-68 B (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Rufete	597
a 07-69 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Pipajo	598
b 07-69 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Pipajo	599
07-69 A (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Pipajo	600
a 07-69 B (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Pipajo	601
b 07-69 B (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Pipajo	602
a 07-70 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Garnacha	603
b 07-70 A (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Garnacha	604
07-70 B (1)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Garnacha	605
07-70 A (2)	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Garnacha	606
07-71 A	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Mazuelo	608
a 07-71 B	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Mazuelo	609
b 07-71 B	Sierra de Salamanca	Santibañez	10/12/2007	Mazuelo	610
07-72 A	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	611
a 07-72 B	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	612
b 07-72 B	Toro	Morales de Toro	10/9/2007	Tempranillo	613
07-74 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	615
07-74 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	616
a 07-75 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	617
b 07-75 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	618
07-75 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	619
07-76 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	620
07-76 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	621
07-78 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	623
a 07-78 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	624
b 07-78 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	625
07-79 A	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	626

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha recogida	Variedad	Código Cultivo Monospórico
a 07-79 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	627
b 07-79 B	Ribera del Duero	Valbuena de Duero	10/10/2007	Tempranillo	628
07-80 A	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	629
07-81 B	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	630
07-82 A	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	631
a 07-83 A	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	632
b 07-83 A	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	633
a 07-83 B	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	634
b 07-83 B	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	635
c 07-83 B	Toro	San Román de Hornija	10/11/2007	Tinta de Toro	636
a 07-84 A	Cigales	Cigales	10/10/2007	Tinta de Toro	637
b 07-84 A	Cigales	Cigales	10/10/2007	Tinta de Toro	638
a 07-84 B	Cigales	Cigales	10/10/2007	Tinta de Toro	639
b 07-84 B	Cigales	Cigales	10/10/2007	Tinta de Toro	640
07-85 B	Cigales	Cigales	10/10/2007	Tinta de Toro	641
a 07-86 A (1)	Cigales	Dueñas	10/10/2007	Tinta de Toro	642
a 07-86 A (2)	Cigales	Dueñas	10/10/2007	Tinta de Toro	644
b 07-86 A (2)	Cigales	Dueñas	10/10/2007	Tinta de Toro	645
a 07-86 B (2)	Cigales	Dueñas	10/10/2007	Tinta de Toro	646
b 07-86 B (2)	Cigales	Dueñas	10/10/2007	Tinta de Toro	647

Es interesante destacar que en muchos casos fue posible recuperar aislados fenotípicamente diferentes a partir de la misma o de distintas bayas de un mismo racimo, como es el caso de los aislados presentados en la imagen de la Figura 12. Una vez determinados los perfiles de marcadores moleculares AFLP generados en este trabajo, hemos podido comprobar posteriormente que éstos, además, son genéticamente diferentes. Esta situación se tiene en cuenta a la hora de presentar los códigos de las cepas recogidas en la Tabla 5. Así, las letras “a”, “b”, “c”... identifican aislados diferentes procedentes de un mismo racimo. La Figura 13 muestra una imagen del aspecto que presentan cuatro aislados monospóricos derivados de una cepa madre. En este caso se observa diversidad fenotípica entre ellos, lo que puede interpretarse considerando que la cepa madre era aún una mezcla de dos o más aislados de campo de *B. cinerea* diferentes o que el aislado original segrega tipos diferentes en la descendencia asexual debido probablemente a la naturaleza heterocarionte de aquélla.

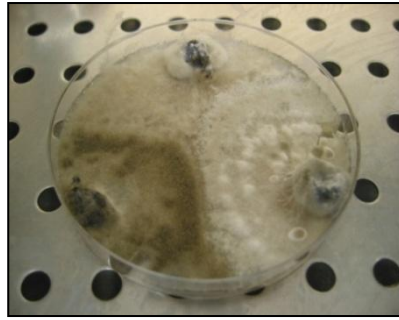


Figura 12. Imagen de una placa de Petri con medio PDA en la que se desarrollan tres cepas de *B. cinerea* fenotípicamente diferentes obtenidas a partir de bayas procedentes del mismo racimo.

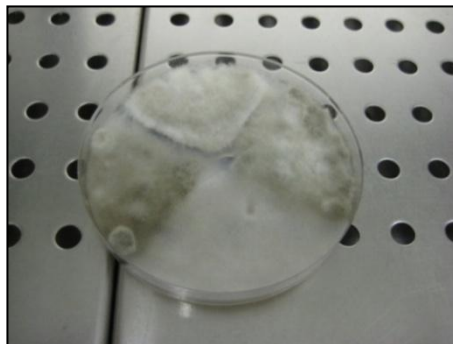


Figura 13. Aislados de *B. cinerea* de cultivo monospóricos obtenidos de una misma cepa madre.

En total, durante la campaña de 2007 se recogieron un total de 216 racimos. Fue posible recuperar al menos un aislado de *B. cinerea* de 182 de los 216 racimos analizados, lo que nos permite estimar que al menos un 84,25% de los racimos analizados portaban propágulos de *B. cinerea*, independientemente de que los racimos estuvieran manifestando o no síntomas de podredumbre gris. La Tabla 6 presenta los datos de la presencia de *B. cinerea* en los racimos por zona productora visitada. De los 182 racimos infectados, 151 ya mostraban síntomas en campo (micelio visible) y 31 fueron racimos asintomáticos.

Tabla 6. Racimos analizados y racimos con *B. cinerea* por zona productora (campaña 2007).

DO	Nº racimos recogidos	Nº racimos con Botrytis	% incidencia	Nº racimos infectados con síntomas	Nº de racimos infectados sin síntomas
Arribes	44	40	90,90%		
Cigales	8	6	75,00%		
Ribera del Duero	94	71	76,00%		
Rueda	17	17	100,00%		
Sierra de Salamanca	26	25	96,15%		
Toro	26	23	88,46%		
Total	216	182	84,25%	151	31

En resumen, a partir de los racimos recogidos y analizados en la campaña 2007 se han purificado un total de 427 cepas de campo de *B. cinerea* (Tabla 5). La Tabla 7 muestra la distribución de aislados por zona productora y por variedad de uva de origen.

Tabla 7. Aislados de *B. cinerea* (colección 2007) divididos por DO y variedad de uva.

	Ribera Duero	Toro	Cigales	Arribes	Rueda	Sierra de Salamanca
Tempranillo	73	16	0	18	10	21
Tinta de toro	0	12	10	0	0	0
Juan Garcia	0	0	0	34	0	0
Bruñal	0	0	0	6	0	0
Rufete	0	0	0	4	0	15
Gajo Arroba	0	0	0	6	0	0
Viura	11	0	0	0	6	0
Verdejo	0	0	0	0	12	0
Sauvignon Blanc	0	0	0	0	5	0
Garnacha	6	6	0	0	0	4
Malvasía	0	12	0	12	0	0
Tempranillo Blanco	0	0	0	0	0	6
Moscatel	0	0	0	0	0	12
Pedro Jiménez	0	0	0	0	0	5
Merlot	7	0	0	0	0	0
Malbec	19	0	0	3	0	0
Pinot Noir	2	0	0	0	0	0
Cab. Sauvignon	24	0	0	0	0	0
Albillo	17	0	0	0	0	0
Petit Verdó	1	0	0	0	0	0
Syrah	0	0	0	8	0	0
Tinta Jeromo	0	0	0	6	0	0
Bastardillo	0	0	0	1	0	0
Jerez Palomino	0	0	0	2	0	0
Maldón	0	0	0	3	0	0
Pipajo	0	0	0	0	0	5
Mazuelo	0	0	0	0	0	3
Varias	2	0	2	0	0	0
TOTAL	162	46	12	103	33	71

1.2 – AISLADOS RECOGIDOS EN CAMPAÑAS PREVIAS: 1999-2002

Nuestro grupo llevó a cabo un seguimiento parcial de la incidencia de *B. cinerea* en nuestros viñedos en campañas previas, concretamente durante las campañas 1999, 2001 y 2002. Se visitaron entonces diversos viñedos, en algunos casos exactamente los mismos viñedos visitados durante la campaña 2007, de las Denominaciones de Origen Ribera del Duero, Toro, Rueda, Cigales, Bierzo y Arribes (esta última por aquellas fechas todavía no había alcanzado la distinción de Denominación de Origen).

Siguiendo los métodos descritos en este trabajo se recogieron muestras de material vegetal sintomático y asintomático durante la campaña 2002 y se obtuvieron 199 cultivos de *B. cinerea* en forma de cepas madre a partir de los cuales se generaron los correspondientes derivados monospóricos. Estos aislados constituyen el germen de nuestra colección de cepas de campo de *B. cinerea* recogidos sobre vid en Castilla y León y están conservados en nuestro laboratorio.

Algunos de estos aislados han sido caracterizados previamente en cuanto a su capacidad para producir formas activas de oxígeno (Díez, 2004) o en cuanto a su capacidad para infectar tomate y manzana (Tello, 2006; Tello *et al.*, 2007). Esta caracterización fue muy preliminar y limitada a un número reducido de aislados, pero nos permitió poner a punto los métodos y procedimientos utilizados en el trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral.

Con el objeto de llevar a cabo un análisis fisiológico y genético que nos permitiera considerar el factor temporal en el conjunto de aislados seleccionados decidimos seleccionar una representación de los aislados recolectados en la campaña 2002. La Tabla 8 presenta los aislados seleccionados (44) de la colección de aislados de 2002 para su análisis fisiológico y genético en este trabajo junto con los aislados de 2007.

Tabla 8. Colección de cepas de *B. cinerea* recogidos en la campaña 2002 y utilizados en este trabajo.

Identificación Cepas Madre	D.O.	Lugar de Recogida (Término Municipal)	Fecha (m/d/a)	Variedad de vid	Código Cultivo Monospórico
VMAS 1	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/18/2002	Tempranillo	1
VMAS 4	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/18/2002	Tempranillo	4
VMAS 7	Ribera del Duero	Roa	10/21/2002	Cabernet Sauvignon	7
VMAS 8	Ribera del Duero	Roa	10/21/2002	Cabernet Sauvignon	8
VMAS 9	Ribera del Duero	Roa	10/21/2002	Albillo	9
VMAS 10	Ribera del Duero	Roa	10/21/2002	Merlot	10
VMAS 22	Cigales	Cigales	10/24/2002	Garnacha	22
VMAS 25	Toro	Toro	10/21/2002	Tempranillo	25
VMAS 26	Toro	Toro	10/21/2002	Tempranillo	26
VMAS 27	Toro	Toro	10/21/2002	Verdejo	27
VMAS 28	Toro	Toro	10/21/2002	Verdejo	28
VMAS 30	Toro	Toro	10/21/2002	Malvasía	30
VMAS 33	Toro	Toro	10/21/2002	Moscatel	33
VMAS 37	Rueda	Rueda	11/02/2002	Viura	37
VMAS 48	Rueda	Rueda	11/02/2002	Malbec	48
VMAS 52	Ribera del Duero	Roa	11/13/2002	Tempranillo	52
VMAS 59	Ribera del Duero	Roa	9/24/2002	Tempranillo	59
VMAS 64	Ribera del Duero	Aranda de Duero	9/27/2002	Tempranillo	64
VMAS 65	Ribera del Duero	Aranda de Duero	9/27/2002	Tempranillo	65
VMAS 99	Cigales	Cigales	10/15/2002	Tempranillo	99
VMAS 103	Toro	Morales de Toro	10/16/2002	Tempranillo	103
VMAS 116	Rueda	Rueda	10/16/2002	Tempranillo	116
VMAS 126	Rueda	Rueda	10/16/2002	Tempranillo	126
VMAS 131	Arribes	Saucele	11/12/2002	Tempranillo	131
VMAS 138	Bierzo	Bembibre	11/13/2002	Tempranillo	138
VMAS 148	Rueda	Rueda	10/7/2002	Verdejo	148
VMAS 149	Rueda	Rueda	10/7/2002	Viura	149
VMAS 151	Ribera del Duero	Roa	10/9/2002	Tempranillo	151
VMAS 153	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/9/2002	Cabernet Sauvignon	153
VMAS 154	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/9/2002	Tempranillo	154
VMAS 156	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/9/2002	Merlot	156
VMAS 160	Ribera del Duero	Pesquera de Duero	10/9/2002	Albillo	160
VMAS 164	Toro	Toro	10/9/2002	Palomino	164
VMAS 165	Toro	Toro	10/9/2002	Teta de Cabra	165
VMAS 166	Toro	Toro	10/9/2002	Tinta de Toro	166
VMAS 170	Cigales	Cigales	10/14/2002	Tempranillo	170
VMAS 175	Arribes	Villarino	10/23/2002	Verdejo Godello	175
VMAS 177	Arribes	Villarino	10/23/2002	Rufete	177
VMAS 178	Arribes	Pereña de la Ribera	10/23/2002	Juan Garcia	178
VMAS 180	Arribes	Pereña de la Ribera	10/23/2002	Tinta Jeromo	180
VMAS 182	Arribes	Villarino	10/23/2002	Tempranillo	182
VMAS 188	Arribes	Villarino	10/23/2002	Bruñal	188
VMAS 198	Arribes	Fermoselle	10/23/2002	Malvasía	198
VMAS 199	Arribes	Fermoselle	10/23/2002	Gajo Arroba	199

Antes de su utilización en este trabajo se comprobó que todos los aislados eran aislados de *B. cinerea* utilizando el método de diagnóstico molecular basado en la amplificación del marcador molecular tipo SCAR (Rigotti *et al.*, 2002) utilizado anteriormente. En todos los casos se amplificó el fragmento de DNA esperado.

1.3 – LA POBLACIÓN DE TRABAJO EN ESTE ESTUDIO

Presentamos a continuación las características de la población seleccionada para llevar a cabo nuestro trabajo. Como se ha indicado anteriormente, se trabajó con cultivos monospóricos de los aislados de campo para garantizar la individualidad de cada aislado y, en la medida de lo posible, su uniformidad genética.

De la colección de aislados de campo recogidos en las campañas 2002 y 2007 en los viñedos de Castilla y León por nuestro grupo de investigación y conservadas en la colección del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca se seleccionaron 310 aislados, 266 de la campaña 2007 (marcadas en amarillo en la Tabla 5) y 44 de la campaña 2002 (Tabla 8). En nuestro análisis se incluyeron, además, una serie de cepas externas. Las cepas B05.10, T4 y Bd90 son tres cepas de referencia de *B. cinerea*. Las cepas UCA001, UCA156 y UCA206 son cepas de campo de *B. cinerea* cedidas por el Prof. Dr. Jesús Cantoral, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Cádiz: se trata de aislados de campo de *B. cinerea* recogidos en Andalucía a partir de fresa la primera de ellas y de vid las dos últimas. Finalmente, como control en algunas de las caracterizaciones llevadas a cabo en este estudio se ha utilizado un aislado de colección (obtenido a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo) de la especie *B. aclada* (el origen de todas estas cepas se describe en Materiales y Métodos). La Tabla 9 recoge el listado de todas las cepas seleccionadas para llevar a cabo su caracterización fisiológica y genética, indicando la variedad de uva a partir de la que se realizó cada aislamiento y la zona productora a la que pertenece en cada caso el viñedo correspondiente.

Por diferentes razones, esencialmente de tipo técnico, no todos los aislados fueron utilizados en todos los análisis llevados a cabo. Así, el análisis fisiológico sobre judía y el análisis de crecimiento saprofito fue realizado con todos los aislados seleccionados, excepto con el aislado 182a, debido a problemas de crecimiento de este aislado en medio sólido. Para la caracterización fisiológica sobre judía se seleccionó una subpoblación de aislados, integrada por los aislados que se indican en la sección 2 del capítulo Resultados. Finalmente para la caracterización genética y el análisis poblacional se trabajó con 285 aislados, aquéllos para los cuales fue posible obtener ADN de calidad suficiente para el análisis de AFLPs y con los que se generaron electroferogramas susceptibles de ser analizados con las tres combinaciones de cebadores utilizados. Con 25 de los aislados, marcados en rojo en la Tabla 9, falló una u otra combinación de cebadores. Estos 25 aislados fueron excluidos del análisis poblacional.

Tabla 9. Aislados de *B. cinerea* caracterizados en este estudio.

Cepa	D.O.	Variedad
202	Ribera del Duero	Tempranillo
206	Ribera del Duero	?
207	Ribera del Duero	?
209	Ribera del Duero	Tempranillo
211	Ribera del Duero	Tempranillo
212	Ribera del Duero	Tempranillo
216	Toro	Tinta de Toro
217	Toro	Tinta de Toro
222	Toro	Tinta de Toro
223	Toro	Tinta de Toro
224	Cigales	?
227	Cigales	?
228	Arribes	Tempranillo
229	Arribes	Tempranillo
230	Arribes	Tempranillo
231	Arribes	Tempranillo
232	Arribes	Tempranillo
233	Arribes	Malbec
235	Arribes	Malbec
246	Arribes	Juan García
247	Arribes	Juan García
248	Arribes	Juan García
249	Arribes	Juan García
250	Arribes	Juan García
251	Arribes	Juan García
253	Arribes	Jerez Palomino
254	Arribes	Jerez Palomino
257	Arribes	Juan García
258	Arribes	Juan García
260	Arribes	Juan García
261	Arribes	Juan García
263	Arribes	Juan García
264	Arribes	Bruñal
265	Arribes	Bruñal
266	Arribes	Bruñal
267	Arribes	Bruñal
269	Arribes	Bruñal
274	Arribes	Rufete
275	Arribes	Rufete
276	Arribes	Rufete
277	Arribes	Rufete
281	Arribes	Juan García
283	Arribes	Juan García
285	Arribes	Juan García
287	Arribes	Juan García
288	Arribes	Juan García
290	Arribes	Tempranillo
292	Arribes	Tempranillo
293	Arribes	Tempranillo
296	Arribes	Tempranillo
297	Arribes	Tempranillo
298	Arribes	Tempranillo
299	Arribes	Tempranillo
300	Arribes	Tempranillo
301	Arribes	Tempranillo
304	Arribes	Gajo Arroba
305	Arribes	Gajo Arroba
307	Arribes	Gajo Arroba
309	Arribes	Juan García
310	Arribes	Juan García
312	Arribes	Juan García
315	Arribes	Juan García
316	Arribes	Juan García
317	Arribes	Juan García
322	Arribes	Maldón
325	Arribes	Malvasía
326	Arribes	Malvasía
327	Arribes	San Jeromo
328	Arribes	San Jeromo
329	Arribes	San Jeromo
330	Arribes	San Jeromo
351	Ribera del Duero	Tempranillo
352	Ribera del Duero	Tempranillo
354	Ribera del Duero	Tempranillo
355	Ribera del Duero	Tempranillo
356	Ribera del Duero	Tempranillo
362	Ribera del Duero	Tempranillo
363	Ribera del Duero	Tempranillo
366	Ribera del Duero	Tempranillo
367	Ribera del Duero	Tempranillo
368	Ribera del Duero	Tempranillo
369	Ribera del Duero	Tempranillo
371	Ribera del Duero	Tempranillo
372	Ribera del Duero	Tempranillo
375	Ribera del Duero	C. Sauvignon
376	Ribera del Duero	C. Sauvignon
377	Ribera del Duero	C. Sauvignon
378	Ribera del Duero	C. Sauvignon
380	Ribera del Duero	C. Sauvignon
381	Ribera del Duero	C. Sauvignon
394	Ribera del Duero	Malbec
397	Ribera del Duero	Malbec
399	Ribera del Duero	Malbec
400	Ribera del Duero	Malbec
403	Ribera del Duero	Malbec
407	Ribera del Duero	Albillo
409	Ribera del Duero	Albillo
412	Ribera del Duero	Albillo
413	Ribera del Duero	Albillo
414	Ribera del Duero	Albillo
417	Ribera del Duero	Albillo
418	Ribera del Duero	Albillo
423	Ribera del Duero	Tempranillo
425	Ribera del Duero	Tempranillo
426	Ribera del Duero	Tempranillo
428	Ribera del Duero	Tempranillo
429	Ribera del Duero	Tempranillo
430	Ribera del Duero	Tempranillo
431	Ribera del Duero	Tempranillo
432	Ribera del Duero	Viura
434	Ribera del Duero	Viura
435	Ribera del Duero	Viura
437	Ribera del Duero	Viura
440	Ribera del Duero	Viura
443	Ribera del Duero	Garnacha
444	Ribera del Duero	Garnacha
446	Ribera del Duero	Garnacha
448	Ribera del Duero	Garnacha
454	Ribera del Duero	Tempranillo
458	Ribera del Duero	Tempranillo
459	Ribera del Duero	Tempranillo
460	Ribera del Duero	Tempranillo
461	Ribera del Duero	Tempranillo
464	Ribera del Duero	Tempranillo
465	Ribera del Duero	Tempranillo
469	Ribera del Duero	Tempranillo
471	Ribera del Duero	Tempranillo
472	Ribera del Duero	Tempranillo
473	Ribera del Duero	Tempranillo
474	Rueda	Viura
475	Rueda	Viura
476	Rueda	Viura
477	Rueda	Viura
478	Rueda	Viura
479	Rueda	Viura
480	Rueda	Verdejo
481	Rueda	Verdejo
482	Rueda	Verdejo
483	Rueda	Verdejo
484	Rueda	Verdejo
485	Rueda	Verdejo
486	Rueda	Verdejo
487	Rueda	Verdejo
488	Rueda	Verdejo
489	Rueda	Verdejo

490	Rueda	Verdejo
492	Rueda	Tempranillo
493	Rueda	Tempranillo
494	Rueda	Tempranillo
495	Rueda	Tempranillo
496	Rueda	Tempranillo
497	Rueda	Tempranillo
499	Rueda	Tempranillo
501	Rueda	Tempranillo
502	Rueda	Sauvignon Blanc
503	Rueda	Sauvignon Blanc
504	Rueda	Sauvignon Blanc
505	Rueda	Sauvignon Blanc
506	Rueda	Sauvignon Blanc
507	Toro	Tempranillo
508	Toro	Tempranillo
509	Toro	Tempranillo
511	Toro	Tempranillo
513	Toro	Tempranillo
515	Toro	Tempranillo
517	Toro	Tempranillo
519	Toro	Tempranillo
520	Toro	Garnacha
521	Toro	Garnacha
522	Toro	Garnacha
523	Toro	Garnacha
524	Toro	Garnacha
525	Toro	Garnacha
526	Toro	Malvasía
527	Toro	Malvasía
528	Toro	Malvasía
529	Toro	Malvasía
530	Toro	Malvasía
531	Toro	Malvasía
532	Toro	Malvasía
533	Toro	Malvasía
534	Toro	Malvasía
535	Toro	Malvasía
536	Toro	Malvasía
538	Toro	Malvasía
539	Sierra de Salamanca	Tempranillo
540	Sierra de Salamanca	Tempranillo
541	Sierra de Salamanca	Rufete
542	Sierra de Salamanca	Rufete
543	Sierra de Salamanca	Rufete
544	Sierra de Salamanca	Rufete
545	Sierra de Salamanca	Rufete
546	Sierra de Salamanca	Rufete
547	Sierra de Salamanca	Rufete
548	Sierra de Salamanca	Rufete
549	Sierra de Salamanca	Rufete

550	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
551	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
552	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
553	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
554	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
555	Sierra de Salamanca	Tempranillo Blanco
561	Sierra de Salamanca	Moscatel
562	Sierra de Salamanca	Moscatel
563	Sierra de Salamanca	Moscatel
568	Sierra de Salamanca	Pedro Jiménez
569	Sierra de Salamanca	Pedro Jiménez
570	Sierra de Salamanca	Pedro Jiménez
571	Sierra de Salamanca	Pedro Jiménez
572	Sierra de Salamanca	Pedro Jiménez
573	Sierra de Salamanca	Rufete
574	Sierra de Salamanca	Rufete
576	Sierra de Salamanca	Tempranillo
577	Sierra de Salamanca	Tempranillo
578	Sierra de Salamanca	Tempranillo
580	Sierra de Salamanca	Tempranillo
581	Sierra de Salamanca	Tempranillo
582	Sierra de Salamanca	Tempranillo
583	Sierra de Salamanca	Tempranillo
584	Sierra de Salamanca	Tempranillo
585	Sierra de Salamanca	Tempranillo
588	Sierra de Salamanca	Tempranillo
589	Sierra de Salamanca	Tempranillo
592	Sierra de Salamanca	Tempranillo
594	Sierra de Salamanca	Tempranillo
595	Sierra de Salamanca	Rufete
596	Sierra de Salamanca	Rufete
597	Sierra de Salamanca	Rufete
598	Sierra de Salamanca	Pipajo
599	Sierra de Salamanca	Pipajo
602	Sierra de Salamanca	Pipajo
603	Sierra de Salamanca	Garnacha
604	Sierra de Salamanca	Garnacha
610	Sierra de Salamanca	Mazueto
611	Toro	Tempranillo
612	Toro	Tempranillo
613	Toro	Tempranillo
615	Ribera del Duero	Tempranillo
616	Ribera del Duero	Tempranillo
617	Ribera del Duero	Tempranillo
618	Ribera del Duero	Tempranillo
620	Ribera del Duero	Tempranillo
621	Ribera del Duero	Tempranillo
623	Ribera del Duero	Tempranillo
624	Ribera del Duero	Tempranillo

625	Ribera del Duero	Tempranillo
626	Ribera del Duero	Tempranillo
627	Ribera del Duero	Tempranillo
628	Ribera del Duero	Tempranillo
629	Toro	Tinta de Toro
631	Toro	Tinta de Toro
632	Toro	Tinta de Toro
633	Toro	Tinta de Toro
634	Toro	Tinta de Toro
635	Toro	Tinta de Toro
636	Toro	Tinta de Toro
637	Cigales	Tinta de Toro
638	Cigales	Tinta de Toro
639	Cigales	Tinta de Toro
640	Cigales	Tinta de Toro
641	Cigales	Tinta de Toro
642	Cigales	Tinta de Toro
644	Cigales	Tinta de Toro
645	Cigales	Tinta de Toro
646	Cigales	Tinta de Toro
647	Cigales	Tinta de Toro
1a	Ribera del Duero	Tempranillo
4a	Ribera del Duero	Tempranillo
7b	Ribera del Duero	Cabernet Sauvignon
8b	Ribera del Duero	Cabernet Sauvignon
9c	Ribera del Duero	Albillo
10b	Ribera del Duero	Merlot
22b	Cigales	Garnacha
25b	Toro	Tempranillo
26a	Toro	Tempranillo
27b	Toro	Verdejo
28b	Toro	Verdejo
30a	Toro	Malvasía
33c	Toro	Moscatel
37b	Rueda	Viura
48b	Rueda	Malbec
52a	Ribera del Duero	Tempranillo
59c	Ribera del Duero	Tempranillo
64a	Ribera del Duero	Tempranillo
65a	Ribera del Duero	Tempranillo
99a	Cigales	Tempranillo
103a	Toro	Tempranillo
116a	Rueda	Tempranillo
126c	Rueda	Tempranillo
131a	Arribes	Tempranillo
138b	Bierzo	Tempranillo
148c	Rueda	Verdejo
149b	Rueda	Viura
151b	Ribera del Duero	Tempranillo
153a	Ribera del Duero	Cabernet Sauvignon
154c	Ribera del Duero	Tempranillo

156b	Ribera del Duero	Merlot
160c	Ribera del Duero	Albillo
164b	Toro	Palomino
165a	Toro	Teta de Cabra
166c	Toro	Tinta de Toro
170c	Cigales	Tempranillo Verdejo Godello
175a	Arribes	

177a	Arribes	Rufete
178c	Arribes	Juan García
180c	Arribes	Tinta Jeromo
182a	Arribes	Tempranillo
188b	Arribes	Bruñal
198c	Arribes	Malvasia
199c	Arribes	Gajo Arroba

B05.10	Alemania	Desconocido
UCA 001	Huelva	Fresa
UCA 156	Jerez de la Frontera	Vid
UCA 206	Jerez de la Frontera	Vid
Bd 90	Francia	Vid
T4	Francia	Tomate
B. aclada	CECT	

2 - CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Se inició entonces la caracterización fisiológica de la colección de aislados seleccionados. En esta caracterización se incluyeron en total 316 aislados de campo de *B. cinerea* y un aislado de *B. aclada* y se centró en dos aspectos concretos: (1) la capacidad de crecimiento saprofítico en medios de cultivo sintéticos (MEA) y (2) la capacidad para infectar a la planta huésped. Esta capacidad para infectar a un huésped fue evaluada en varias especies de plantas hospedadoras, concretamente en judía, en tomate y en vid. Y en el caso de la vid el análisis fue llevado a cabo sobre distintas variedades blancas (Verdejo, Albillo Mayor, Albillo Real) y sobre distintas variedades tintas (Tempranillo, Tinta de Toro, Garnacha y Prieto Picudo).

2.1 - CRECIMIENTO SAPROFÍTICO

Para evaluar la capacidad de crecimiento saprofítico de los distintos aislados de campo de *B. cinerea* se estimó el crecimiento radial de la colonia del hongo que se desarrolla en un medio sintético (MEA) a partir de un inóculo inicial depositado en el centro de una placa de cultivo. Este tipo de análisis se llevó a cabo con todo el conjunto de aislados seleccionados. Como estimación del crecimiento radial se determinó el diámetro de la colonia transcurridas 72 horas desde que se depositó el inóculo inicial en el centro de la placa (ver Materiales y Métodos).

La Figura 14 presenta los datos obtenidos para cada cepa analizada como media de las estimaciones realizadas sobre tres placas de medio sintético y sus respectivos errores estándar.

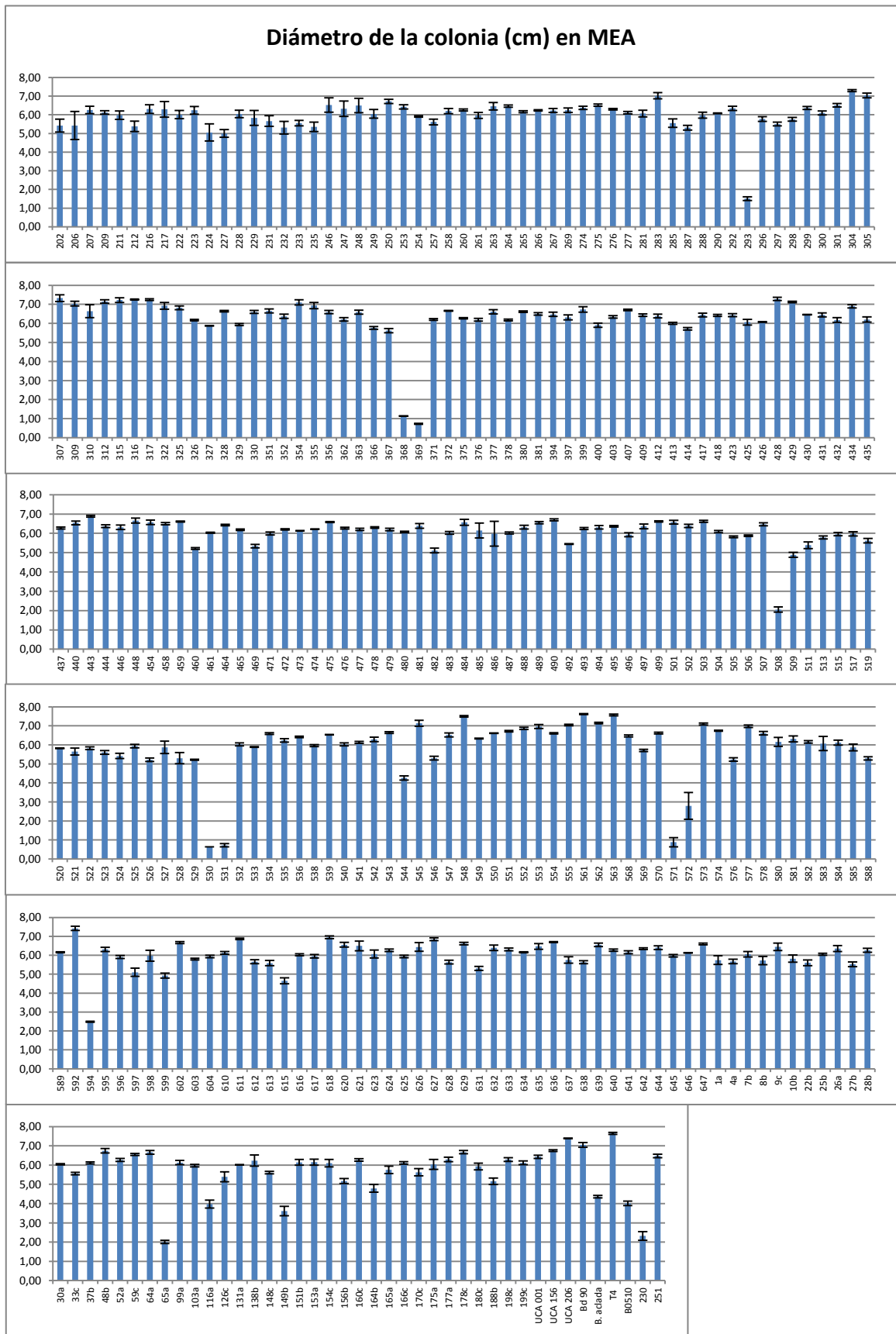


Figura 14. Crecimiento radial (diámetro medio de la colonia en cm a las 72h) en placas de medio MEA de los aislados de campo analizados. Se indica en cada caso el error estándar.

El análisis de los datos obtenidos indica que existe un grado de variación importante en cuanto a la capacidad de crecimiento saprofítico entre los aislados analizados. El rango de expresión de este carácter varía entre el desarrollo muy limitado (prácticamente nulo. El diámetro de la colonia es el diámetro del inóculo inicial, un cilindro de agar con micelio de 0,64 cm de diámetro) de la cepa 530 (a las 72 horas) y los 7,62 cm de la cepa 561, si bien la mayor parte de los aislados tienen capacidades de crecimiento elevadas.

Para facilitar la descripción de la población decidimos establecer "clases" entre el conjunto de aislados que nos permitieran agrupar los aislados con un grado de expresión del carácter similar. Así, y de forma arbitraria, decidimos dividir todo el rango de variación en intervalos de 0,5 cm a partir del diámetro medio menor determinado (cepa 530 - 0,64 cm), estableciendo un total de 14 clases. Los aislados entonces fueron clasificados como pertenecientes a una clase u otra en función de su diámetro. La Tabla 10 muestra las clases definidas, el intervalo de variación de cada una, la media y su respectivo error estándar y el número de aislados incluidos en cada clase.

Tabla 10. Clases fenotípicas definidas en función del grado de expresión del carácter "crecimiento saprofítico en medio MEA", rango de variación de cada una de ellas, media y error estándar y número de aislados que se incluyen en cada una.

Intervalo de Crecimiento	Rango de Crecimiento	Número de Aislados	Media	Error Estándar
I	0,64 – 1,14	5	0,82	0,07
II	1,15 – 1,65	1	1,51	0,10
III	1,66 – 2,16	2	2,03	0,11
IV	2,17 – 2,67	2	2,40	0,12
V	2,68 – 3,18	1	2,79	0,71
VI	3,19 – 3,69	1	3,62	0,24
VII	3,70 – 4,20	2	3,99	0,16
VIII	4,21 – 4,71	3	4,42	0,11
IX	4,72 – 5,22	11	5,06	0,16
X	5,23 – 5,73	38	5,51	0,16
XI	5,74 – 6,24	103	6,03	0,11
XII	6,25 – 6,75	113	6,46	0,10
XIII	6,76 – 7,26	25	7,02	0,09
XIV	7,27 – 7,77	9	7,45	0,06
Total		316	6,01	0,11

Cuando los datos obtenidos en estos recuentos se representan en forma de histograma de frecuencias se obtiene la Figura 15. El análisis de la misma indica que, teniendo en cuenta el rango de variación global observado, la mayor parte de los aislados se caracterizan por tener una capacidad de crecimiento moderadamente alto o alto (pertenecientes a las clases IX a XIV) y que existe un número reducido de aislados con una capacidad muy limitada de crecimiento en medio de cultivo sintético.

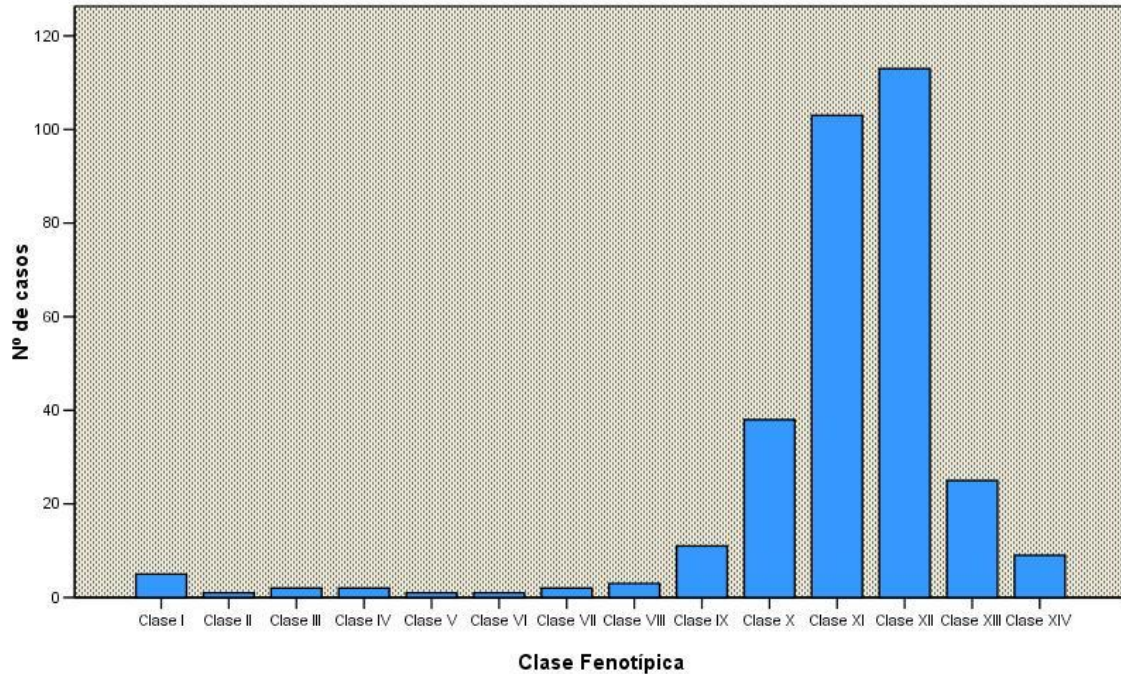


Figura 15. Clases fenotípicas establecidas en función de la capacidad de crecimiento saprofito y número de individuos pertenecientes a cada clase.

Para facilitar la descripción de la distribución de las clases fenotípicas establecidas para el carácter "capacidad de crecimiento saprofito en medio MEA" en la población analizada, se calculó la media de crecimiento saprofito de todos los individuos incluidos en cada clase como la media aritmética del diámetro de la colonia en placas de medio MEA de todos los individuos de cada clase y se determinó el correspondiente error estándar. Los valores obtenidos se presentan también en la Tabla 10 (la tabla de las clases fenotípicas).

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas en relación con el carácter "capacidad de crecimiento saprofito en MEA" se realizó un Análisis de la Varianza para el factor "clase fenotípica" en el programa SPSS. Este análisis demostró que el factor "clase fenotípica" ejerce un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la variable "diámetro medio de la colonia en medio MEA". Existen, por lo tanto, diferencias significativas entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas.

Habiendo determinado que existen diferencias significativas entre las clases fenotípicas, se aplicó el test post-hoc de Tukey para comparar las diferencias significativas entre medias. La Tabla 11 muestra los datos generados al aplicar esta prueba estadística al

conjunto de datos de las clases fenotípicas que manejamos en nuestra descripción. El análisis de la tabla muestra que el análisis estadístico propone la existencia de nueve subgrupos entre las 14 clases fenotípicas establecidas de forma arbitraria inicialmente. El subgrupo 1 incluye únicamente la clase I. Los demás subgrupos están integrados, cada uno de ellos, por dos clases fenotípicas. El subgrupo 1, junto con los subgrupos 2 (clases II y III), 3 (clases IV y V) y 9 (clases XIII y XIV), son subgrupos establecidos sin ambigüedades, claramente diferentes entre sí y diferentes a otros subgrupos. Los subgrupos identificados como 4, 5, 6, 7 y 8, sí muestran cierto nivel de ambigüedad, ya que en estos casos una clase dada puede formar parte de dos subgrupos diferentes. El análisis estadístico propone que la clase VI puede pertenecer tanto al subgrupo 4 como al subgrupo 5, dos subgrupos que muestran entonces una cierta homogeneidad. Por su parte, la clase X puede pertenecer tanto al subgrupo 6 como al subgrupo 7, y la clase XI puede pertenecer tanto al subgrupo 7 como al subgrupo 8. En su conjunto, estos tres subgrupos incluyen las clases más numerosas, caracterizadas por estar integradas por individuos con una capacidad de crecimiento saprofito moderadamente alta.

Tabla 11. Análisis post-hoc mediante el test de Tukey de las diferencias entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas en relación con el carácter "Crecimiento saprofito en medio MEA" (evaluado mediante la estimación del diámetro medio de la colonia en medio MEA –en cm- de los individuos incluidos en cada clase.

Split		Subset for alpha = 0.05								
Group	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Clase I	5	,8230								
Clase II	1		1,5083							
Clase III	2		2,0300							
Clase IV	2			2,5763						
Clase V	1			2,7917						
Clase VI	1				3,6150					
Clase VII	2				3,9950	3,9950				
Clase VIII	3					4,4261				
Clase IX	11						5,0674			
Clase X	38						5,5070	5,5070		
Clase XI	103							6,0344	6,0344	
Clase XII	113								6,4589	
Clase XIII	25									7,0242
Clase XIV	9									7,4507
Sig.		1,000	,065	,987	,492	,277	,247	,059	,301	,294

Del análisis de la tabla se puede concluir que la distribución en clases fenotípicas realizada de manera arbitraria en un principio para facilitar la descripción de la variación del carácter estudiado en esta población de individuos encuentra, en buena medida, justificación estadística.

2.2 - AGRESIVIDAD SOBRE JUDÍA

Decidimos llevar a cabo en segundo lugar una evaluación de la capacidad para infectar a la planta huésped que muestran todas las cepas seleccionadas y evaluadas previamente en relación con su capacidad de crecimiento saprofítico. Aunque nuestro interés se centra en caracterizar los aislados de *B. cinerea* recogidos sobre la especie a partir de la cual han sido recogidos, la vida, y dadas las limitaciones temporales y técnicas que impone su cultivo para disponer de material adecuado para las inoculaciones a lo largo de todo el año, decidimos evaluar la agresividad de los aislados seleccionados sobre un huésped de carácter general que fuera fácilmente manejable en condiciones de invernadero y de laboratorio y del que pudiéramos disponer a lo largo de todo el año. Este huésped nos proporcionaría una primera información sobre "la capacidad general de infectar" a un "huésped tipo". Nuestro planteamiento propone utilizar esta información para seleccionar una muestra representativa de aislados con distintas habilidades de infección sobre judía y con la que llevar a cabo un estudio más detallado sobre variabilidad fisiológica (capacidad de infección) sobre otros huéspedes.

Con este objeto se llevaron a cabo inoculaciones controladas sobre judía en condiciones de laboratorio con los 316 aislados de campo analizados anteriormente en relación con su capacidad de crecimiento saprofítico. Siguiendo los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos se realizaron inoculaciones sobre hojas de judía de plantas de 14 días de edad y con cada aislado se inocularon dos hojas (las primeras hojas – cotiledonares). Los inóculos consistieron en cilindros de medio de cultivo tomados de placas de medio de cultivo (MEA) sobre los que crecía la cepa de interés y en cada hoja se colocaron cinco cilindros de agar para determinar otras tantas lesiones.

En general estos experimentos se realizaron en paralelo con los experimentos de evaluación de la capacidad de crecimiento saprofítico y los cilindros de medio de cultivo con micelio de cada una de las cepas analizadas utilizadas en un tipo de análisis y otro fueron obtenidos a partir de la misma placa madre. Dada la imposibilidad de llevar a cabo las inoculaciones correspondientes con las 316 cepas en un mismo experimento decidimos trabajar en lotes de 30 aislados.

En todos los experimentos se incluyeron siempre dos aislados de referencia a modo de control interno: el aislado 230, que se caracteriza por mostrar un diámetro medio de lesión en judía pequeño (Clase II – 0,76 – 1,00 cm) y el aislado 251 (Clase X), que se caracteriza por presentar un diámetro medio de lesión grande (2,76 – 3,00 cm) (ver Tabla 12). El comportamiento de estos dos aislados nos permitiría evaluar la homogeneidad de los diferentes experimentos realizados.

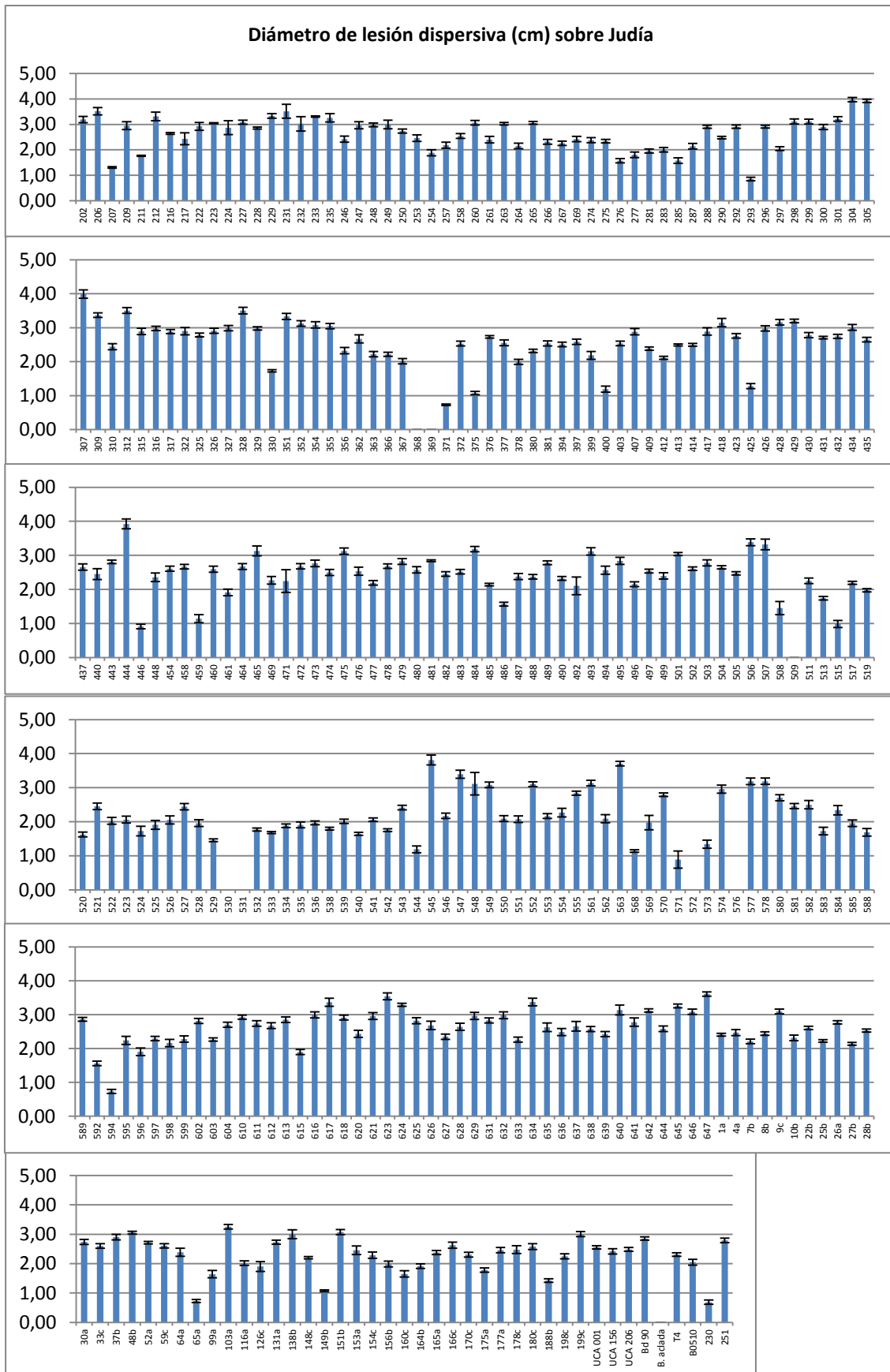


Figura 16. Agresividad de los distintos aislados de *B. cinerea* sobre judía estimada como el diámetro medio de lesión dispersiva (cm) a las 63 horas desde la inoculación.

La Figura 16 muestra los valores medios de diámetro de lesión dispersiva, con los correspondientes errores estándar, obtenidos con todos los aislados analizados.

De la observación de la Figura 16 se deduce que en la población de aislados analizada existe un enorme grado de variabilidad fisiológica en relación con el carácter "agresividad sobre judía". El rango de variación en la expresión del carácter es amplio, desde la incapacidad total para producir lesión alguna, caracterizada por un diámetro medio de lesión = 0 (ej.: aislado 368 o 369), hasta una agresividad muy importante, caracterizada por producir lesiones dispersivas con un diámetro medio de 4 cm medido a las 63 horas desde la inoculación (ej.: aislados 304 o 307).

Como en el caso anterior, para facilitar la descripción de la población y de la variación observada en la misma en relación con la expresión de este carácter se establecieron clases fenotípicas discretas, caracterizadas en este caso por un intervalo de variación de 0,25 cm de diámetro de lesión. La primera clase definida es una clase particular que incluye aislados con un diámetro medio de lesión de 0,00 – 0,50 cm. Las demás clases corresponden al criterio indicado, y tienen, por lo tanto, un rango de variación 0,25 cm. En total se definieron 15 clases fenotípicas (Clase 0 a XIV). Posteriormente los individuos fueron agrupados como pertenecientes a una clase dada en función del diámetro medio de lesión que genera y se determinó el número de aislados que integran cada clase. Los resultados de este agrupamiento se presentan en la Tabla 12 y se representan en forma de histograma de frecuencias en la Figura 17.

La clase 0 incluye un total de 8 individuos que no producen lesión necrótica o, más propiamente hablando, individuos incapaces de producir necrosis apreciable más allá del propio bloque de agar con micelio utilizado como inóculo. Es difícil evaluar la agresividad de estos individuos y establecer diferencias entre ellos porque al realizar las mediciones no se retiró el inóculo inicial. No obstante, es posible indicar que entre éstos hay al menos dos tipos de individuos: aquellos que generan una lesión necrótica justo debajo del inóculo inicial (368, 369, 530, 531, 572, 576 y *B. aclada* (utilizado como referencia)) y aquellos que aparentemente no producen necrosis alguna y que generan un micelio aéreo, muy débil y poco denso, que se desarrolla a partir del bloque de agar del inóculo inicial pero que en manera alguna infecta el tejido vegetal (509). Se trata pues de una clase heterogénea integrada por individuos que comparten su incapacidad para generar necrosis más allá del área del inóculo inicial. Podemos identificar estos individuos como individuos no agresivos con patogenicidad cero. Para facilitar su descripción, a todos los individuos de esta clase se le ha asignado un valor de expresión del carácter agresividad de "0" cm de diámetro medio de lesión.

El resto de los individuos pueden infectar a la judía, siendo posible identificar individuos desde muy poco agresivos hasta individuos muy agresivos en función del diámetro medio de lesión necrótica que cada uno genera. Puede comprobarse que la expresión del carácter "agresividad sobre judía" sigue una distribución de tipo normal, distribución característica de rasgos genéticos complejos que manifiestan una variación continua. Como es típico en estos caracteres, existe un espectro de variación amplio y continuo, siendo más frecuentes los

individuos que manifiestan el fenotipo en un grado medio y menos frecuentes los individuos que manifiestan el carácter en sus formas extremas.

Tabla 12. Clases fenotípicas establecidas para el carácter "agresividad sobre Judía" estimado en función del diámetro medio de lesión dispersiva producido en hojas: Descripción de los intervalos que caracterizan cada clase, número de aislados incluidos en cada una de ellas y valores medios característicos en cada caso con los correspondientes valores de error estándar.

Clase fenotípica	Rango de Variación	Nº de Aislados	Media	Error Estándar
0	0,00 – 0,50	8	0,00	0,00
I	0,51 – 0,75	4	0,72	0,07
II	0,76 – 1,00	4	0,91	0,12
III	1,01 – 1,25	6	1,13	0,07
IV	1,26 – 1,50	6	1,37	0,08
V	1,51 – 1,75	15	1,66	0,08
VI	1,76 – 2,00	23	1,90	0,09
VII	2,01 – 2,25	35	2,14	0,09
VIII	2,26 – 2,50	55	2,39	0,09
IX	2,51 – 2,75	48	2,62	0,08
X	2,76 – 3,00	51	2,88	0,09
XI	3,01 – 3,25	37	3,11	0,09
XII	3,26 – 3,50	13	3,35	0,10
XIII	3,51 – 3,75	6	3,57	0,12
XIV	3,76 – 4,00	5	3,92	0,11
Total		316	2,43	0,08

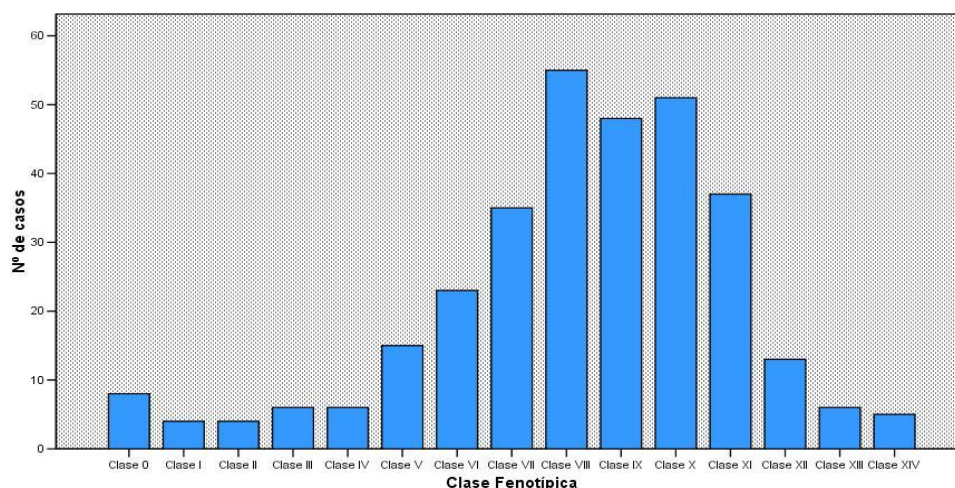


Figura 17. Distribución de los individuos en clases fenotípicas del carácter "agresividad sobre judía" establecidas en función del diámetro medio de lesión sobre hojas de judía. El histograma representa los datos recogidos en la Tabla 12.

Detectamos en nuestro análisis, por lo tanto, aislados que difieren de manera muy importante en el grado agresividad sobre judía, siendo posible identificar en un extremo del rango de variación observado, aislados absolutamente incapaces de generar una lesión detectable visualmente (Clase 0: 368, 369, 509, 530, 531, 572, 576. La cepa de *B. aclada* utilizada como control negativo también se incluiría en esta clase) o con una capacidad de infección muy limitada, que generan lesiones necróticas que apenas se expanden más allá de los límites del punto de inoculación (Clase I: 371, 594, 65a y 230; y Clase II: 293, 446, 515 y 571), y en el otro extremo aislados con una enorme capacidad para infectar los tejidos vegetales y para colonizar los tejidos circundantes, expandiéndose rápidamente y causando una maceración intensa de los tejidos (aislados de las clases XIII y XIV – que incluyen los aislados 206, 231, 328, 563, 623 y 647 la primera de ellas y 304, 305, 307, 444, 545, la segunda). Entre ambos extremos encontramos una diversidad fisiológica muy amplia.

Si bien resultan obvias las diferencias de agresividad observadas, se llevó a cabo un análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de agresividad sobre judía de las distintas clases fenotípicas establecidas agrupando los aislados analizados como hemos indicado anteriormente. Para ello se llevó a cabo un análisis de la varianza para un factor (ANOVA). Este análisis demostró que el factor "clase fenotípica para el carácter agresividad sobre judía" ejerce un efecto significativo sobre la variable "diámetro de la lesión sobre judía" ($P < 0,05$) y que, por lo tanto, existen diferencias significativas entre las medias de las distintas clases establecidas.

El análisis post hoc posterior mediante el test de Tukey permitió comparar las diferencias entre medias y establecer grupos. La Tabla 13 presenta los resultados obtenidos. El estudio de la tabla indica que el análisis estadístico establece 15 subgrupos entre las 15 clases consideradas en este estudio en relación con el carácter "diámetro de lesión sobre judía", grupos con niveles de significación muy altos. Todas las clases son asignadas de manera exclusiva a un único subgrupo. El planteamiento descriptivo de la población resulta, por lo tanto, consistente.

Tabla 13. Análisis post-hoc mediante el test de Tukey de las diferencias entre las medias de las distintas clases fenotípicas establecidas en relación con el carácter "agresividad en judía" (evaluado mediante la estimación del diámetro medio de lesión -en cm- de los individuos incluidos en cada clase).

Clase Fenotípica Infección in Vivo	N	Subset for alpha = .05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Clase 0	8	,000														
Clase I	4		,722													
Clase II	4			,910												
Clase III	6				1,135											
Clase IV	6					1,378										
Clase V	15						1,658									
Clase VI	23							1,905								
Clase VII	35								2,138							
Clase VIII	55									2,392						
Clase IX	48										2,626					
Clase X	51											2,882				
Clase XI	37												3,114			
Clase XII	13													3,350		
Clase XIII	6														3,568	
Clase XIV	5															3,924
Sig.		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

2.3 – CORRELACIÓN ENTRE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO Y AGRESIVIDAD SOBRE JUDÍA

Existiendo variación en las dos características fisiológicas que estamos analizando, la capacidad de crecimiento saprofítico y la agresividad sobre judía, decidimos valorar la existencia de una posible correlación entre ambas características. Con este objetivo se llevó a cabo un análisis de correlación entre la media de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y la media del diámetro de lesión dispersiva generada sobre judía para toda la colección de aislados estudiados.

El análisis llevado a cabo permitió detectar una correlación positiva moderadamente alta entre ambas variables (coeficiente de correlación de Pearson = 0,607) y significativa (al nivel 0,01).

La Figura 18 muestra el diagrama de dispersión obtenido en el análisis de correlación entre las dos variables analizadas. Puede apreciarse la correlación existente: en general aquellos aislados que generan lesiones con un diámetro medio mayor son los aislados que muestran también una capacidad de crecimiento saprofítico mayor. El grado de dispersión observado es elevado, pudiendo identificar diferencias de agresividad muy importantes entre cepas que tienen una capacidad de crecimiento saprofítico similar. Por ejemplo, con un diámetro medio de colonia en medio sintético de 6,2 cm encontramos cepas muy diferentes en cuanto a su agresividad, desde cepas que generan lesiones de 1,0 cm de diámetro hasta cepas que generan lesiones de 3,8 cm de diámetro (cepas unidas por la línea roja).

En resumen, esto supone que una parte importante de la variación observada en la capacidad para infectar a los tejidos del huésped en los distintos aislados puede explicarse como una función de la variabilidad observada en la capacidad de crecimiento saprofítico de los mismos. No obstante, ésta no debe ser la causa única a la que pueda atribuirse aquella variación. Deben existir otros factores que contribuyan a determinar el carácter “agresividad sobre judía” que no son exclusivamente factores relacionados con la capacidad de metabolizar sustratos nutritivos, que es lo que evalúa la capacidad de crecimiento en medios artificiales sintéticos.

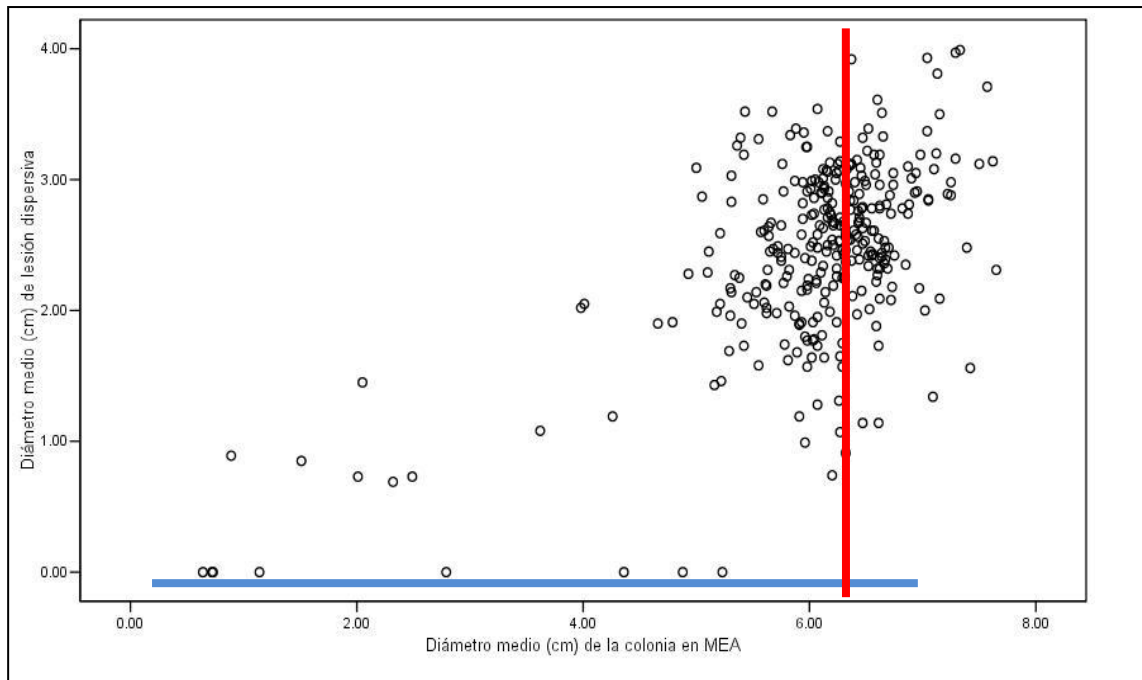


Figura 18. Diagrama de correlación entre el diámetro medio (cm) sobre placas de medio MEA y el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre judía en la población de aislados de campo de *B. cinerea* analizados.

Merece la pena también considerar una observación interesante en relación con la identificación de un grupo de aislados que teniendo capacidades de crecimiento en medios sintéticos muy diferentes (368, 369, 509, 530, 531, 572 y 576) se muestran todos ellos como incapaces para infectar los tejidos del huésped (son avirulentos) (cepas unidas por una línea azul) (la cepa de *B. aclada*, incluida en el análisis fisiológico, también ha sido incluida en este análisis de correlación). Teniendo en cuenta que todos los aislados obtenidos y analizados en este trabajo han sido recogidos a partir de racimos de vid, será interesante determinar si estas cepas son o no capaces de infectar, y en qué medida, otros huéspedes.

2.4 - AGRESIVIDAD SOBRE VARIEDADES DE VID Y SOBRE TOMATE

Dada la existencia de diferencias de agresividad sobre judía se seleccionaran aislados representativos de cada clase con el objeto de profundizar en la caracterización fisiológica de un grupo reducido de los mismos llevando a cabo un estudio de agresividad más detallado sobre otras especies de plantas huésped, concretamente sobre distintas variedades de vid y sobre tomate.

Las cepas de *B. cinerea* seleccionadas fueron: 206 (Clase XIII), 207 (Clase IV), 230 (control negativo) (Clase I), 251 (control positivo) (Clase X), 276 (Clase V), 285 (Clase V), 293 (Clase II), 305 (Clase XIV), 371 (Clase I), 372 (Clase IX), 375 (Clase III), 378 (Clase VI), 429 (Clase XI), 431 (Clase IX), 432 (Clase IX), 435 (Clase IX), 443 (Clase X), 444 (Clase XIV), 446 (Clase II), 448 (Clase VIII), 458 (Clase IX), 459 (Clase III), 460 (Clase IX), 469 (Clase VIII), 474 (Clase VIII), 509 (Clase 0), 515 (Clase II), 544 (Clase III), 545 (Clase XIV), 568 (Clase III), 573 (Clase IV), 592 (Clase V), 594 (Clase I), B0510 (Clase VII), 1a (Clase VIII), 65a (Clase I) y 149b (Clase III).

En un principio las inoculaciones fueron realizadas sobre las variedades Tintas de vid Tempranillo, Garnacha, Prieto Picudo y Tinta de Toro y sobre las variedades Blancas Verdejo, Albillo Real y Albillo Mayor. Las variedades Tempranillo y Verdejo tienen una importancia diferenciada en comparación con las otras variedades, ya que son las variedades más importantes en la producción de vino tinto y en la producción de vino blanco, respectivamente, en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Ambas variedades, por esta razón, presentan un particular interés en nuestro estudio. Posteriormente se llevaron a cabo inoculaciones sobre la variedad de tomate Roma.

Los ensayos de infección en las distintas variedades de vid y en tomate fueron realizados siguiendo esencialmente el mismo planteamiento y los mismos procedimientos básicos utilizados en judía. En todos los casos la infección fue provocada en hojas cortadas de las distintas variedades de vid y tomate utilizando cilindros de agar tomados del borde de crecimiento de placas de cultivo MEA sobre las que se estaba desarrollando el micelio de la cepa correspondiente del patógeno. El diámetro de las lesiones fue medido a las 93 horas después de la inoculación en el caso de las inoculaciones sobre hojas de vid y 63 horas después de la inoculación en el caso de las inoculaciones sobre hojas de tomate.

En todos los experimentos se incluyeron siempre dos cepas de referencia a modo de control interno: la cepa 230, que se caracteriza por mostrar un diámetro medio de lesión en judía pequeño (Clase I: 0,51 cm – 0,75 cm) y la cepa 251 (Clase X), que se caracteriza por presentar un diámetro medio de lesión en judía grande (2,76 cm – 3,00 cm). El comportamiento de estas dos cepas nos permitiría evaluar la homogeneidad de los diferentes experimentos realizados.

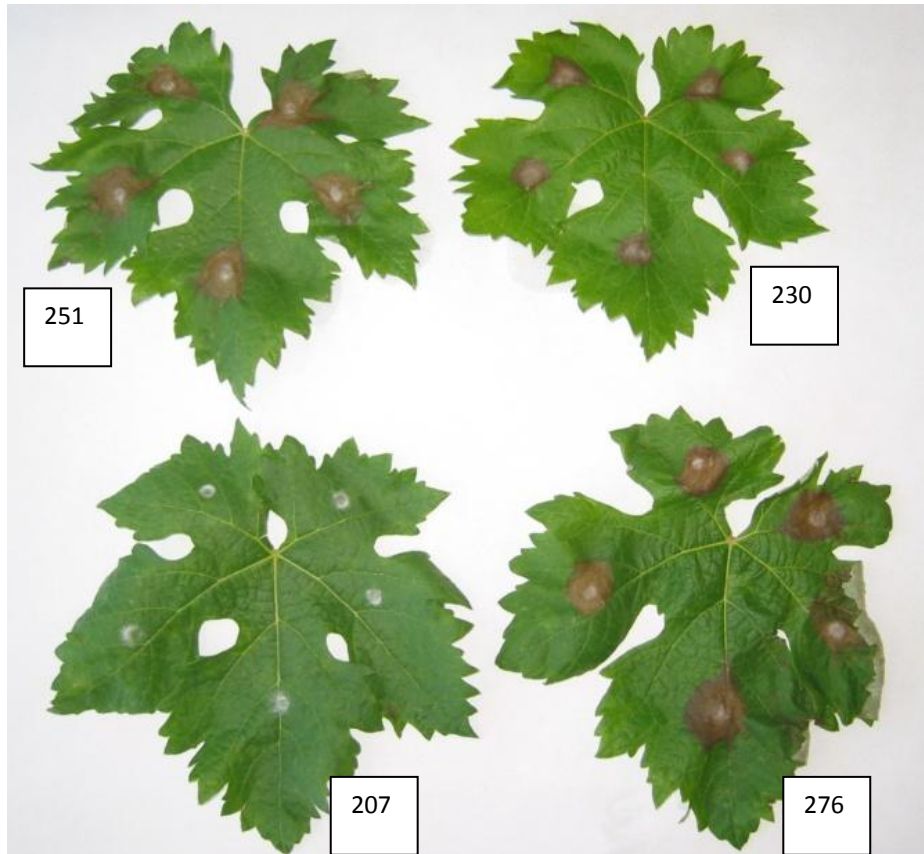


Figura 19. Imagen que muestra ejemplos de las lesiones producidas por cuatro cepas diferentes de *B. cinerea* (de arriba y de izquierda a la derecha: 251, 230, 207 y 276) inoculadas sobre hojas de la variedad de vid Tempranillo en el momento de tomar las mediciones.

En la Figura 19 se muestra una imagen con un ejemplo de la infección de *B. cinerea* llevada a cabo en hojas de vid. Las Figuras 20 y 21 muestran los resultados obtenidos en estos experimentos sobre cuatro variedades tintas y sobre tres variedades blancas, respectivamente. En cada histograma se presentan los valores medios de diámetro de lesión dispersiva generada por cada aislado, junto con los correspondientes valores de error estándar, determinados sobre cada una de las siete variedades de vid. En cada histograma se presentan, además, el valor medio del diámetro de lesión generada por el conjunto de aislados seleccionados sobre la variedad de vid correspondiente (ML) y el valor medio del diámetro de lesión producido por los aislados que generan lesiones dispersivas en cada variedad (Mi). La Figura 22 presenta los resultados obtenidos en las inoculaciones llevadas a cabo sobre hojas de tomate. En esta última figura se incluye el histograma que muestra el comportamiento del conjunto de aislados seleccionados en las inoculaciones llevadas a cabo previamente sobre hojas de judía y el comportamiento de los mismos en relación a su capacidad de crecimiento saprofítico en placa de medio MEA para facilitar el análisis conjunto de los datos obtenidos.

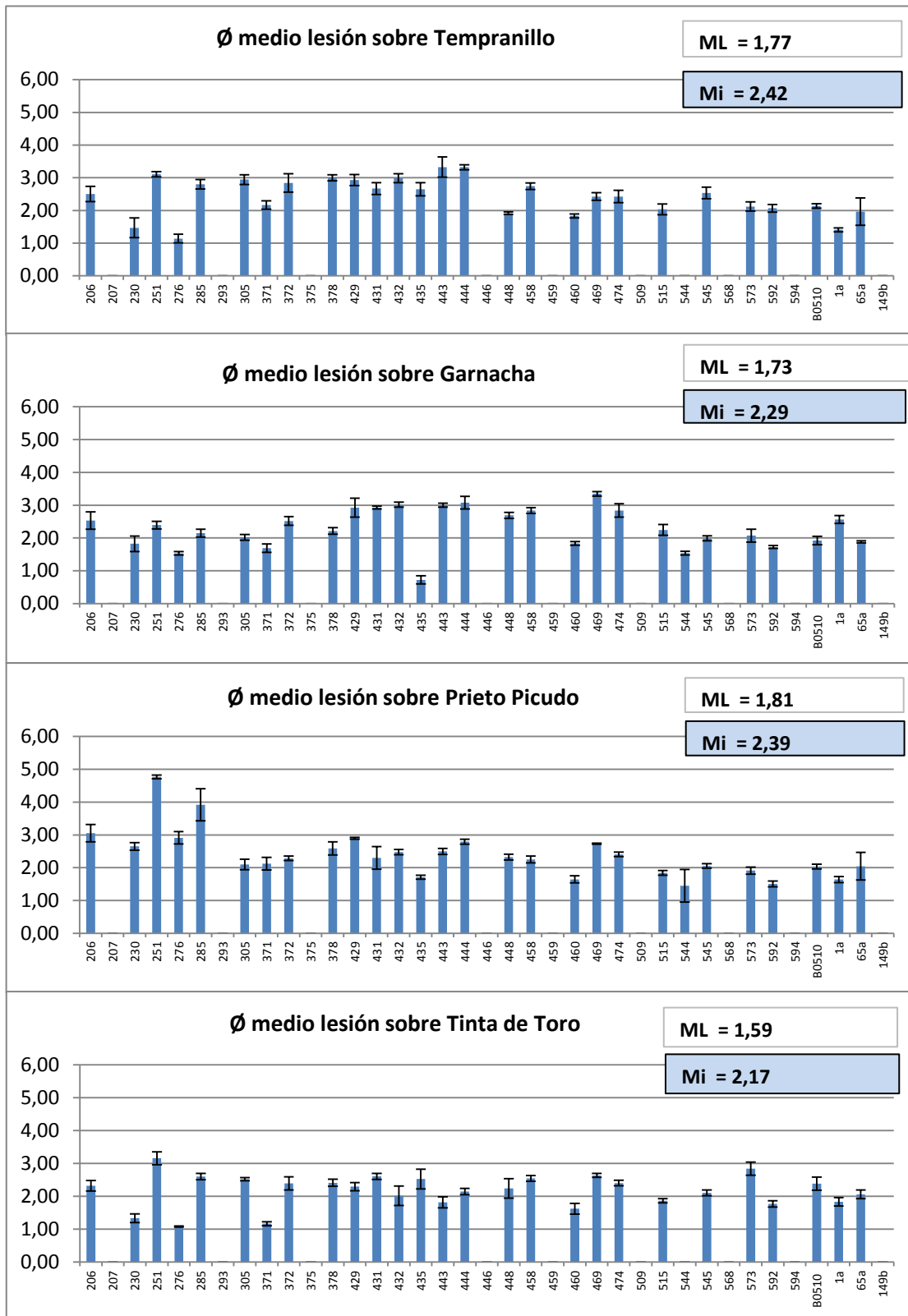


Figura 20. Agresividad sobre las variedades tintas de vid Tempranillo, Garnacha, Prieto Picudo y Tinta de Toro, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 93 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de *B. cinerea*.

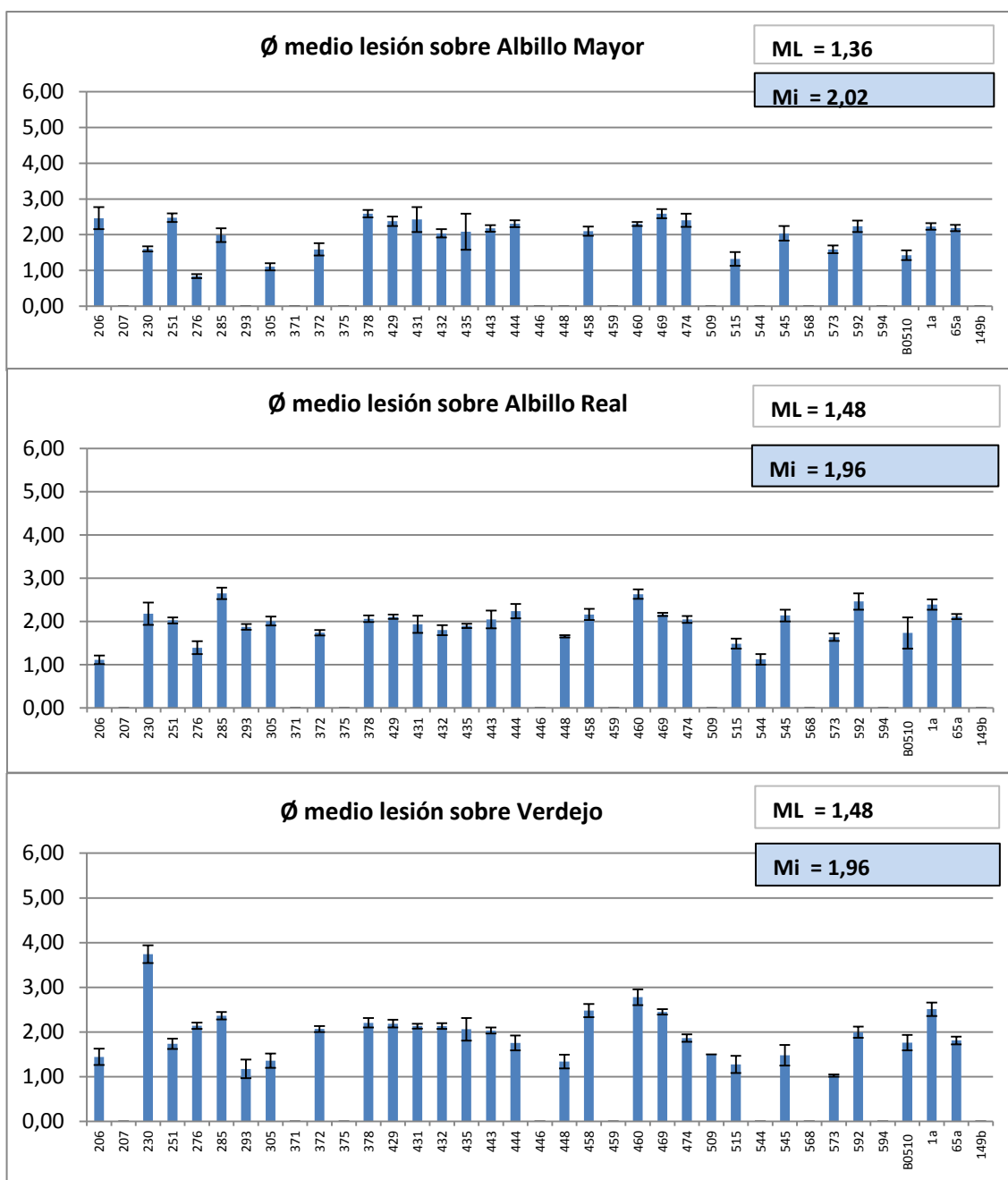


Figura 21. Agresividad sobre variedades blancas de vid Verdejo, Albillo Real y Albillo Mayor, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 93 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de *B. cinerea*.

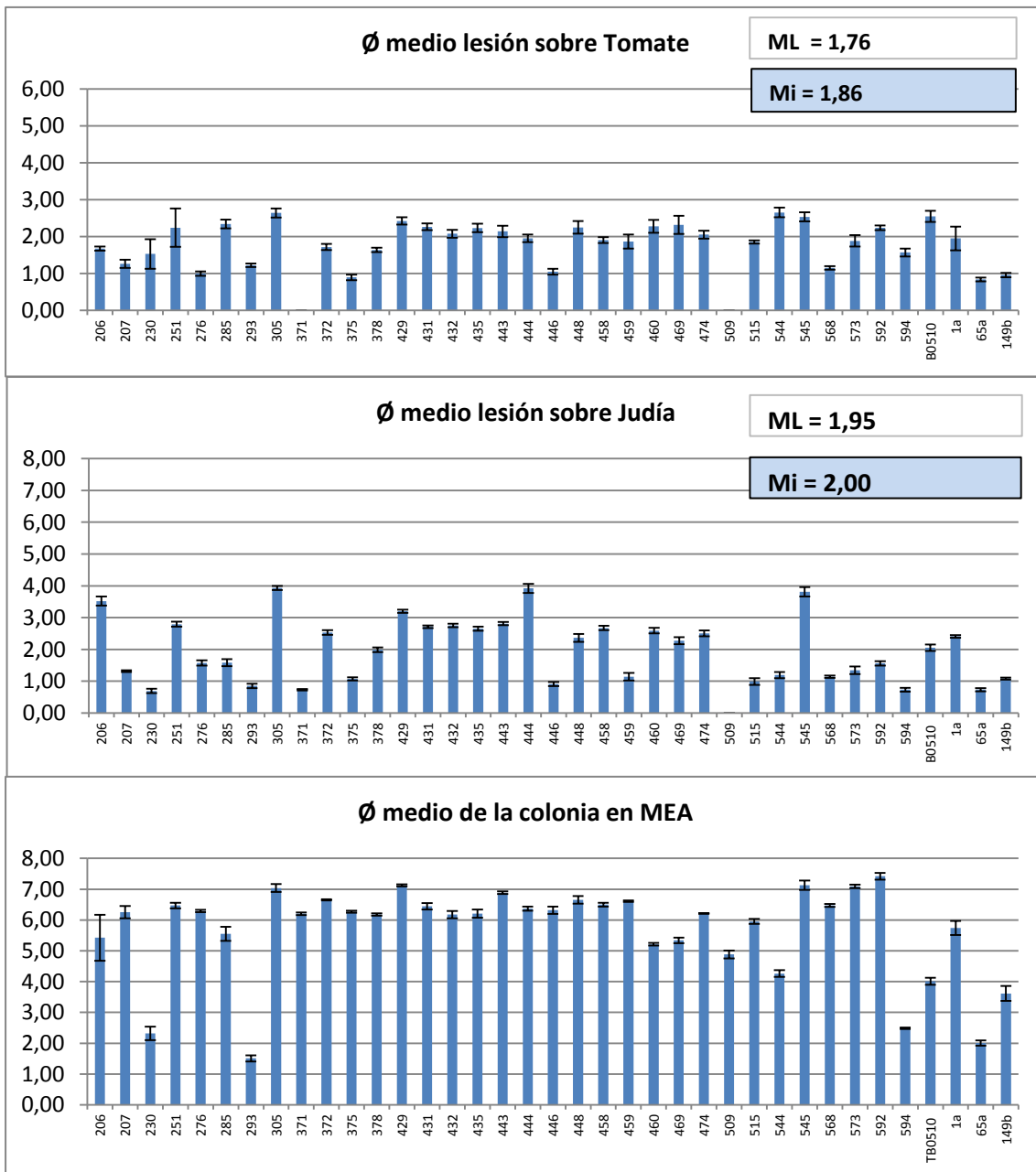


Figura 22. Agresividad sobre tomate y sobre judía, estimada como el diámetro medio (cm) de lesión dispersiva sobre hoja 63 horas después de la inoculación, de la subpoblación seleccionada de aislados de campo de *B. cinerea*. En la parte inferior de la figura se presenta el histograma correspondiente que muestra la capacidad de crecimiento saprofito de los aislados analizados (el segundo y tercer histogramas se han preparado con los datos extraídos de los histogramas que se presentan en las figuras 15 y 13, respectivamente).

El análisis de los datos generados ofrece elementos de información interesantes, tanto en relación con el comportamiento de los distintos huéspedes evaluados frente al conjunto de aislados analizados como en relación con el comportamiento particular de cada aislado sobre todos los huéspedes en conjunto.

Una primera observación de las Figuras 20, 21 y 22, muestra que, al igual que existe diversidad fisiológica en cuanto a su agresividad sobre judía entre los aislados seleccionados, también se detecta diversidad fisiológica en cuanto a su agresividad sobre las distintas variedades de vid y sobre tomate. Es decir, sobre cada huésped en particular (variedades de vid y tomate -y judía-) el comportamiento del conjunto de aislados es diferente, si bien cabe destacar que este comportamiento, como veremos más adelante, es bastante uniforme sobre todas las variedades de vid consideradas y más evidente si se analizan en particular por una parte las cuatro variedades Tintas de vid y por otra las tres variedades Blancas de vid. En otras palabras, es posible decir que **el perfil de patogenicidad que dibuja el conjunto de aislados seleccionados sobre cada huésped es diferente** (hecha la salvedad del comportamiento uniforme observado sobre las variedades tintas y sobre las variedades blancas), **lo que sugiere que cada huésped presenta una configuración particular de factores que median en la susceptibilidad/resistencia del huésped al patógeno.**

Sobre judía, de los 37 aislados analizados sólo 1 aislado, el número 509, es incapaz de causar infección. Los 36 restantes lo hacen y muestran un rango de variación amplio en el diámetro medio de lesión que producen (de 0,69 a 3,93 cm). En tomate, de los 37 aislados estudiados, 2 son incapaces de infectar, los aislados 371 y 509. Las demás (35) sí infectan tomate y muestran en conjunto un rango de variación en el diámetro medio de lesión dispersiva importante (de 0,84 a 2,66 cm), aunque menor que el que muestran sobre judía. El diámetro medio de lesión producido por el conjunto de aislados en tomate es igual a 1,76 cm y en judía es igual a 1,95 cm, y el diámetro medio de lesión producida por los aislados que son capaces de producir una lesión dispersiva (presentado en cada figura como Mi), y que constituye un estimador más apropiado de la capacidad de colonización, marca esta diferencia entre ambos huéspedes de manera más acentuada (2,00 cm sobre judía y 1,86 cm sobre tomate). Todo ello sugiere que ambos huéspedes, la variedad de judía "Riñón" y la variedad de tomate "Roma", muestran un comportamiento similar frente a la colección de aislados seleccionada en cuanto a su capacidad (o no) de impedir el ingreso del patógeno. **Una vez iniciada la infección parece que las diferencias entre los distintos aislados en cuanto a su capacidad para hacer uso de los sustratos nutritivos que obtienen a partir del huésped y para colonizar los tejidos circundantes se acentúan en judía (rango de variación entre los aislados mayor) y que el comportamiento del conjunto de aislados sobre tomate es más uniforme (rango de variación menor).** (Es posible argumentar que el tomate es un huésped más pasivo frente a *Botrytis* y que el patógeno dispone de una dotación enzimática básica que proporciona a todos los aislados una capacidad más similar y uniforme para colonizar los tejidos de tomate. A la hora de colonizar los tejidos foliares de judía, unos y otros aislados probablemente utilicen

combinaciones particulares de factores más específicos de cada aislado que pueden resultar más o menos eficientes).

En esta misma línea de análisis cabe destacar el comportamiento de la vid. En este caso 9-10 de los 37 aislados en el caso del análisis llevado a cabo sobre las variedades tintas y 09-12 de los 37 aislados en el caso de los análisis llevados a cabo sobre las variedades blancas, son incapaces de infectar al huésped. De ellos, 8 son comunes en ambos casos e incapaces absolutamente de infectar variedad alguna de vid. Por lo tanto, es posible deducir que el patógeno tiene más dificultad para penetrar en los tejidos de este huésped y para iniciar la infección que en el caso de la judía y del tomate. Puesto que la serie de aislados es siempre la misma, quizás resulte más apropiado decir que **la vid es más resistente al ingreso patógeno que la judía y el tomate.**

Una vez que consiguen penetrar, los aislados "agresivos" colonizan los tejidos circundantes: unos con mayor eficiencia y otros con menor eficiencia, pero todos generan lesión. El diámetro medio de lesión producido sobre vid no se puede comparar directamente con el diámetro medio de lesión producido sobre judía o sobre tomate porque en aquel caso el momento en el que se realizan las mediciones es más tardío (93 horas frente a 63 horas). No obstante, sí es posible hacer algunas consideraciones analizando el valor de este índice, que nos proporciona información sobre el tipo de tejido foliar, de vid, de judía o de tomate, que más eficientemente utiliza el patógeno para nutrirse y desarrollarse. Si asumimos las consideraciones realizadas anteriormente, de los datos obtenidos es posible deducir que **en todas las variedades de vid en general, y en particular en las variedades blancas, el progreso de la infección es más lento que en los otros dos huéspedes.**

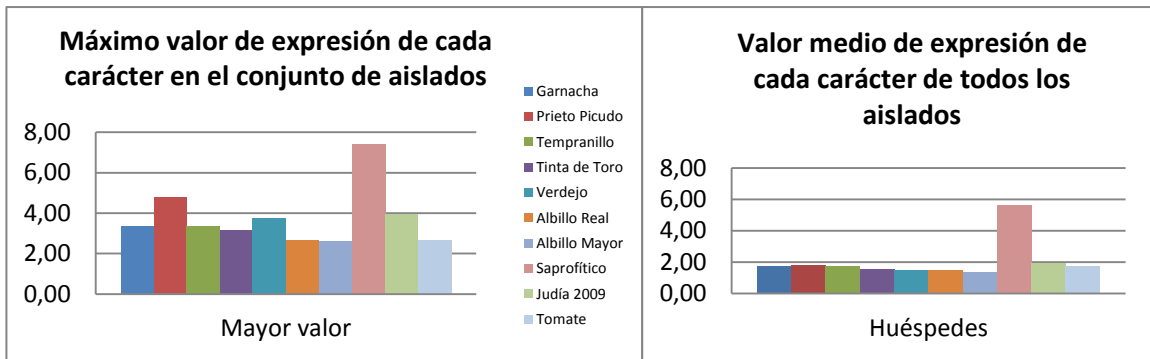
Sí es posible comparar de forma directa en este contexto el comportamiento de las variedades blancas frente a las variedades tintas de vid. Las variedades blancas muestran consistentemente un menor diámetro (de 1,96 cm en la variedad Verdejo a 2,02 en la variedad Albillo Mayor) de lesión dispersiva (Mi) que las variedades tintas (de 2,17 cm en la variedad Tinta de Toro a 2,42 cm en la variedad Tempranillo). Esto supone que **las variedades blancas son más resistentes a *B. cinerea* que las variedades tintas**, con todo lo que estas observaciones implican en cuanto a la búsqueda y utilización de factores implicados en la determinación de la resistencia a este patógeno en las distintas variedades de vid cultivadas en nuestra Comunidad Autónoma.

El análisis del comportamiento de cada aislado de forma individualizada sobre los distintos huéspedes también ofrece información interesante, en este caso en relación con la caracterización de las habilidades de infección particulares de cada aislado. Para llevar a cabo la comparación del comportamiento de unos aislados con otros resulta muy útil tener en cuenta el criterio de clasificación utilizado inicialmente para establecer clases fisiológicas en la colección de aislados y para seleccionar algunos de ellos para un análisis fisiológico más amplio: su agresividad sobre judía. Para facilitar la descripción de los resultados obtenidos y el

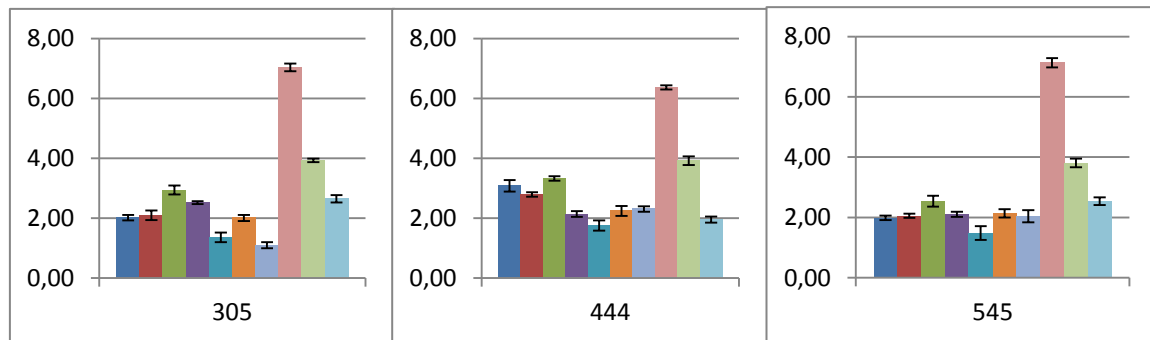
estudio comparativo de los aislados analizados se han agrupado las 15 clases fenotípicas establecidas en función de su agresividad sobre judía en tres grandes categorías o grupos:

- **Grupo A:** Agresividad sobre judía baja. Incluye las clases 0, I, II, III y IV. (diámetro medio de lesión sobre judía de 0 a 1,5 cm);
- **Grupo B:** Agresividad sobre judía moderada. Incluye las clases V, VI, VII, VIII y IX (diámetro medio de lesión sobre judía de 1,51 a 2,75 cm);
- **Grupo C:** Agresividad sobre judía alta. Incluye las clases X, XI, XII, XIII y XIV (diámetro medio de lesión dispersiva sobre judía de 2,76 a 4,00 cm).

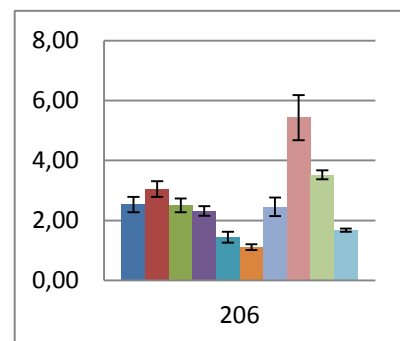
Las Figuras 23, 24 y 25 muestran los histogramas correspondientes de los 37 aislados analizados, presentando en cada caso información sobre su capacidad para infectar a los distintos huéspedes considerados y sobre su capacidad de crecimiento saprofítico. Se comprueba que todos los aislados incluidos en las clases de **la categoría C, altamente agresivas sobre judía**, tienen un comportamiento similar y conforman un grupo ciertamente uniforme. Se trata de cepas con una capacidad de crecimiento saprofítico muy buena, con una agresividad sobre judía muy notable y que también muestran una agresividad notable sobre tomate. Todos estos aislados infectan también a todas las variedades de vid analizadas, observándose en general la tendencia descrita anteriormente: las variedades blancas son un poquito más resistentes y las variedades tintas son un poquito más sensibles a cada aislado considerado. Es posible, entonces, considerar a **estos aislados como buenos saprofitos con una muy buena capacidad para infectar de forma eficiente a un amplio rango de huéspedes (patógenos generalistas)**.



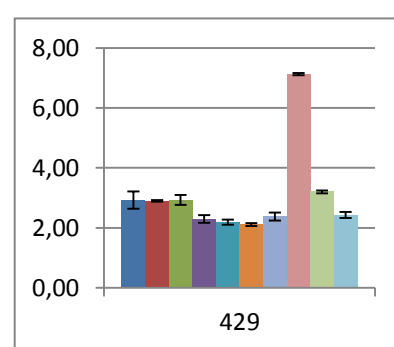
C. Clase XIV



Clase XIII



Clase XI



Clase X

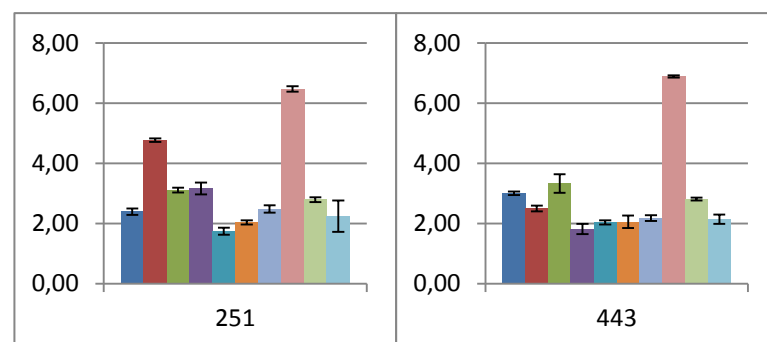


Figura 23. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases XIV, XIII, XI y X. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).

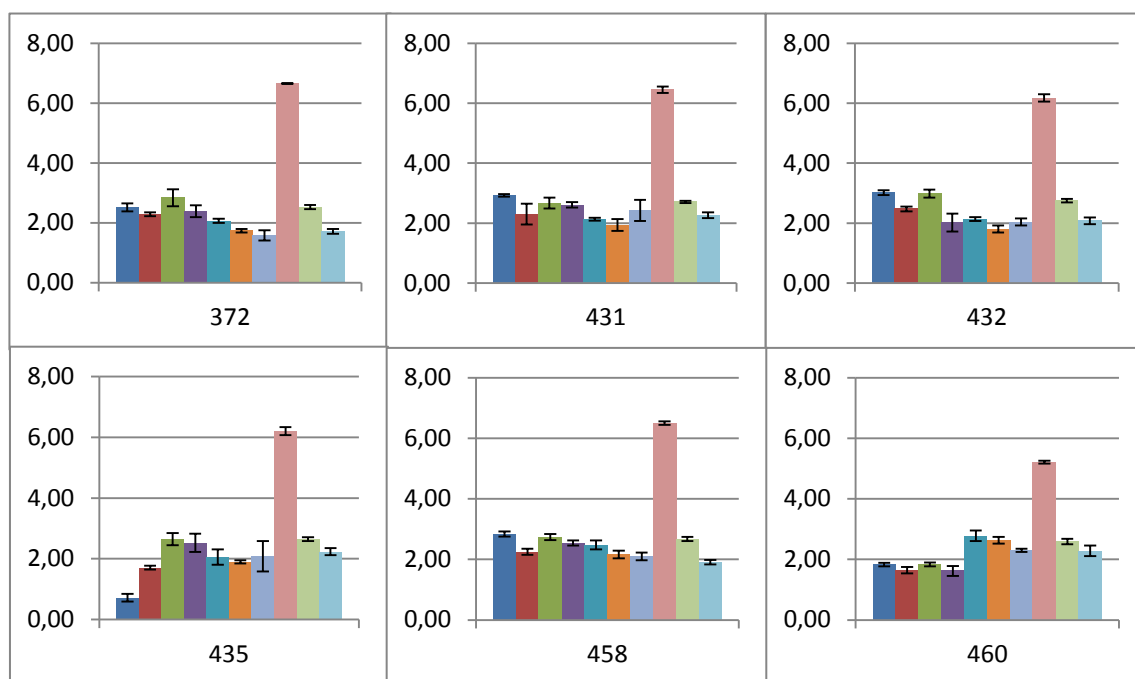
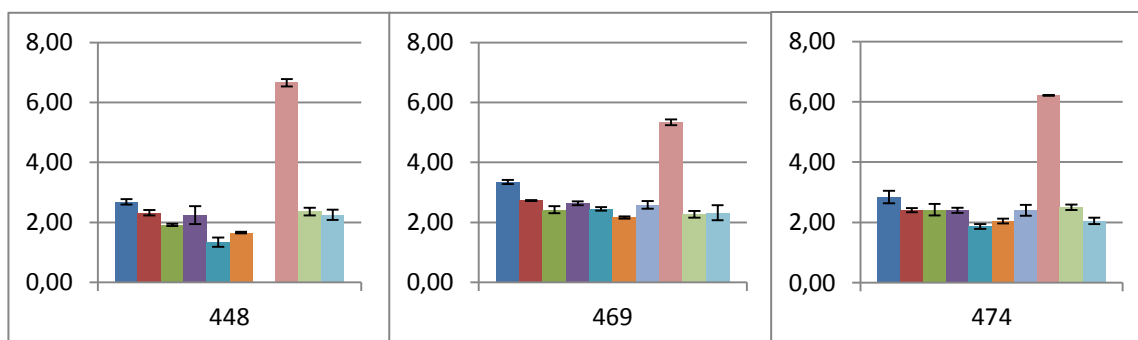
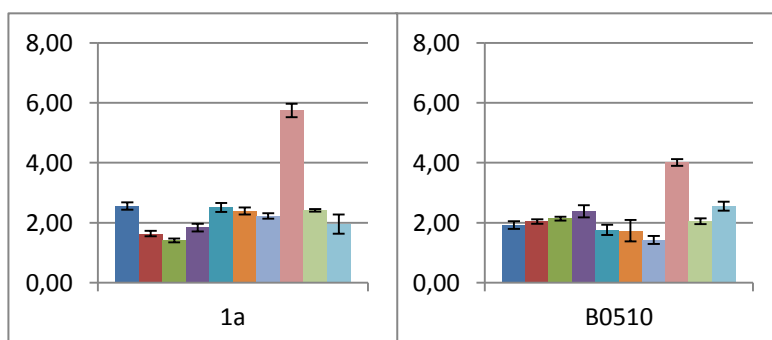
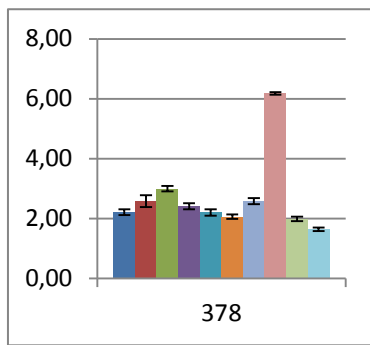
B. Clase IX**Clase VIII****Clase VII**

Figura 24A. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases IX, VIII y VII. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).

Clase VI



Clase V

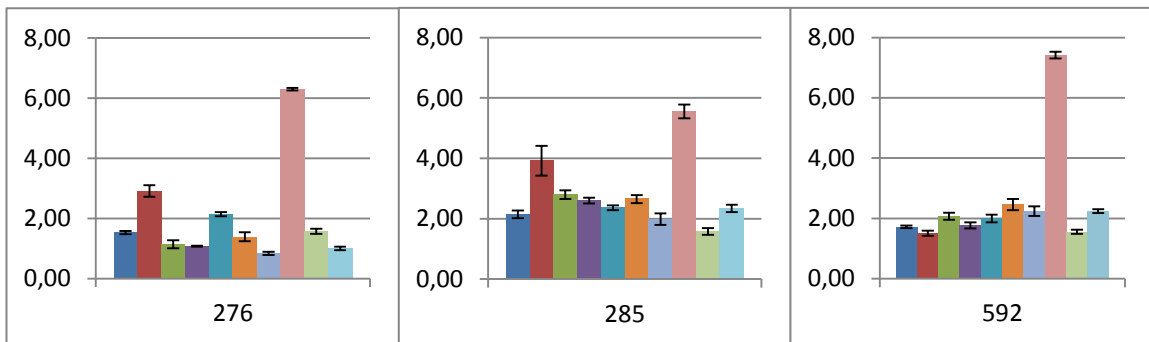
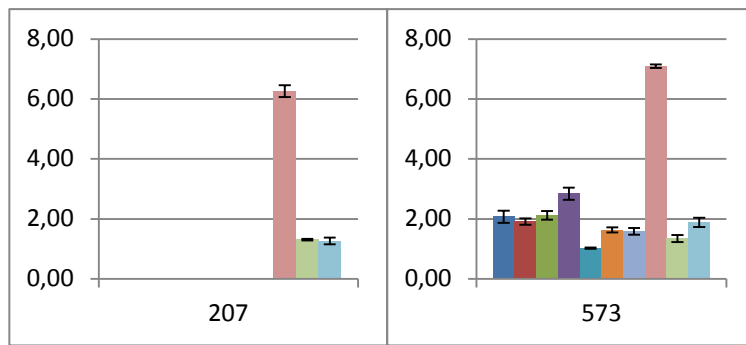
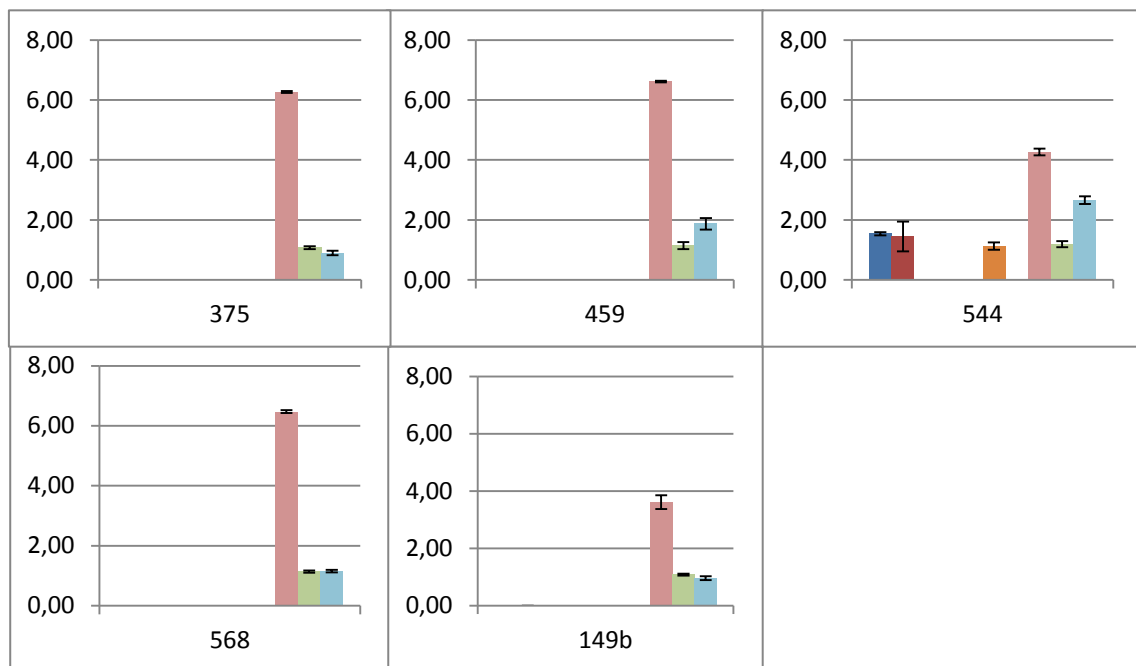


Figura 24B. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases VI y V. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).

A. Clase IV



Clase III



Clase II

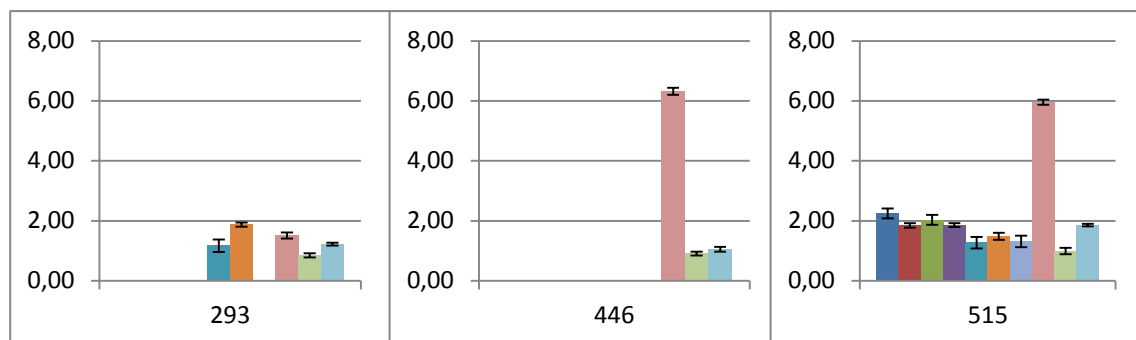
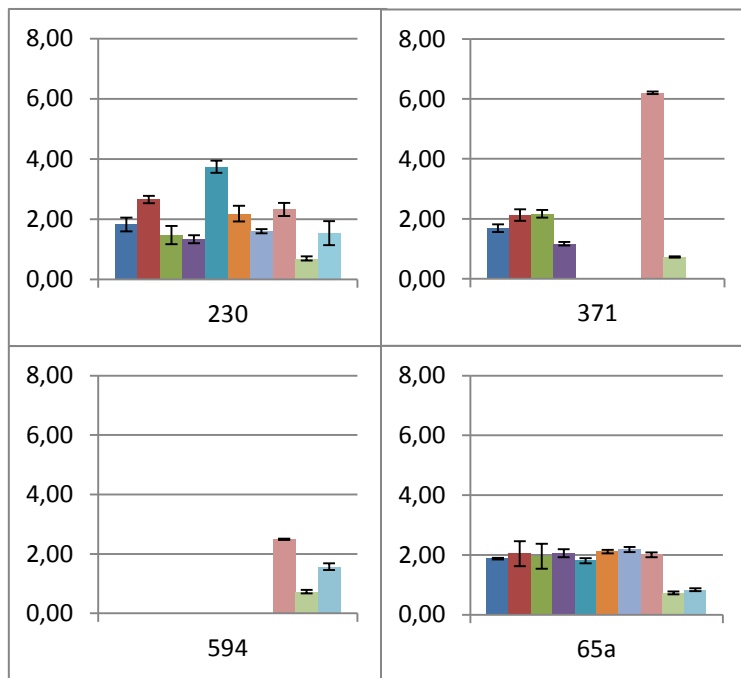


Figura 25A. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases V, IV, III y II. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).

Clase I



Clase 0

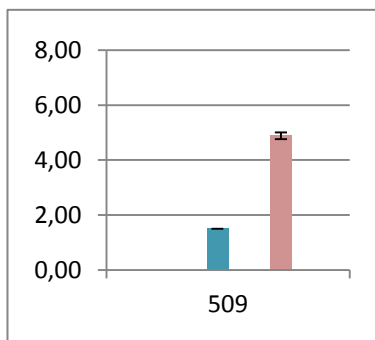


Figura 25B. Caracterización fisiológica de los aislados de las clases I y 0. Para cada aislado se representa el valor medio de diámetro de la colonia en medio MEA (crecimiento saprofítico) y el diámetro medio de lesión dispersiva sobre los huéspedes indicados según el código de color presentado en los dos primeros histogramas de la Figura 22 (que muestran los valores máximo y medio para cada característica en el conjunto de aislados analizados).

Es interesante observar que **el comportamiento de los aislados incluidos en la categoría B es muy similar al comportamiento de los aislados del grupo C**. Obviamente la agresividad sobre judía es ahora menor, pero todos ellos tienen también una buena capacidad de crecimiento saprofítico, infectan también tomate aunque, también como en los aislados del grupo C, lo hacen un poquito más pobremente que a la judía. Además, estos aislados infectan a todas las variedades de vid y lo hacen en un grado muy similar a como lo hacen los aislados del grupo C. Y finalmente, con las excepciones que indicaremos a continuación, estos aislados

son también más agresivos sobre las variedades tintas que sobre las variedades blancas. Es decir, los aislados del grupo C y del grupo B muestran unas características muy similares.

Las dos excepciones sobre las que debemos llamar la atención son, en primer lugar, el aislado 460 y, en segundo lugar, el aislado 1a. Ambos aislados responden a las características generales de las categorías C y B, pero con peculiaridades en relación con su comportamiento sobre vid, ya que ambos aislados parecen ser más agresivos sobre las tres variedades blancas que sobre las cuatro variedades tintas, un comportamiento contrario al observado en los aislados estudiados hasta el momento.

La cepa 448 se comporta como todas las demás pero aparentemente no puede infectar a la variedad Albillo Mayor. Dado que en general el comportamiento de la mayor parte de los aislados resulta ser muy uniforme sobre las tres variedades blancas, por una parte, y sobre las cuatro variedades tintas, por otra, es posible pensar que en nuestros experimentos de inoculación se haya producido un escape al trabajar con este aislado y sobre esta variedad y que, en realidad, el aislado 448 también pueda infectar a la variedad Albillo Mayor. De no ser así, cabría considerar la existencia de factores implicados en la determinación de especificidad a nivel de variedad blanca de vid para el estudio de los cuales este aislado sería interesante.

Finalmente, cabe destacar que en el grupo B se incluye la cepa de referencia B05.10, con un comportamiento en cuanto a agresividad sobre distintos huéspedes similar al de los aislados aquí incluidos, aunque su capacidad de crecimiento saprofítico es menor que el de éstos.

Los aislados incluidos en la categoría A conforman el grupo de aislados más interesante en tanto en cuanto resulta ser más **diverso y heterogéneo**. Teniendo en cuenta sus capacidades de crecimiento saprofítico y de infección de unos y otros huéspedes es posible establecer el siguiente agrupamiento dentro de esta categoría de aislados:

- Identificamos dentro de este grupo, en primer lugar, dos aislados, los identificados con los códigos 573 y 515, cuyo comportamiento recuerda al de los grupos C y B, ya que son buenos saprofitos e infectan a todos los huéspedes, aunque de forma más limitada que aquéllos.
- Identificamos en segundo lugar un conjunto numeroso de aislados (207, 375, 459, 568, 149b y 446) caracterizados por tener también una buena capacidad de crecimiento saprofítico (sólo el aislado 149b tiene un crecimiento saprofítico medio) pero una agresividad sobre judía y tomate muy reducida. Además, estos aislados no infectan en absoluto a ninguna de las variedades de vid consideradas (es interesante destacar en este momento que todos los aislados con los que estamos trabajando han sido obtenidos a partir de racimos de vid sintomáticos o asintomáticos). Dado que estos aislados tienen un buen comportamiento sobre medios de cultivo sintéticos pero no infectan a la vid y muy pobremente a la judía y al tomate es posible considerar a estos aislados como "**patógenos muy débiles**" o como "**no patógenos**".

- Encontramos dos aislados, numerados como 230 y como 65a, que tienen una capacidad de crecimiento saprofítico baja y que apenas son capaces de generar lesión necrótica en judía y en tomate. Sin embargo, estos dos aislados pueden infectar a todas las variedades de vid y de manera eficiente, mostrando el aislado 65a en particular un comportamiento muy homogéneo sobre todas ellas. Puesto que se muestran como no agresivos sobre judía y tomate pero agresivos sobre todas las variedades de vid, consideramos que estas cepas presentan un perfil de patogenicidad muy interesante indicativo de una posible especificidad sobre vid.
- El aislado 371 es otro aislado particularmente interesante. Es un buen saprofito incapaz de infectar judía y tomate. Y sí infecta la vid, pero sólo las variedades tintas: las variedades blancas parecen ser resistentes al ataque de este aislado. Es posible asumir, entonces, que este aislado muestra especificidad por las variedades de vid tintas.
- Los aislados 293 y 594 son dos aislados que muestran una capacidad de crecimiento saprofítico muy pobre y con una capacidad para infectar a sus posibles huéspedes muy limitada (sólo infecta alguno de los huéspedes o variedades consideradas y en una medida muy pequeña).
- Finalmente, los aislados 509 y 544 son dos aislados con una capacidad de crecimiento saprofítico moderado. El primero de ellos es incapaz, prácticamente de manera absoluta, de infectar cualquier huésped. En nuestros experimentos sólo mostró reacción sobre la variedad Verdejo. Por su parte, el aislado 544 mostró en general una capacidad de infectar muy limitada y un comportamiento irregular sobre las distintas variedades de vid.

2.5 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO: CORRELACIONES

Existiendo variación en las características fisiológicas que estamos analizando, la agresividad sobre las distintas variedades de uva, judía y tomate, decidimos valorar la existencia o no de una posible correlación entre estas características. Con este objetivo se llevó a cabo un análisis de correlación entre las medias del diámetro de lesión dispersiva generada sobre los distintos huéspedes para la selección de aislados estudiada. En la Tabla 25 se presentan los valores de correlación obtenidos para las combinaciones de variables indicadas. La capacidad de crecimiento saprofito, estimada como la media del diámetro de la colonia en medio sintético MEA, también ha sido incluida en este análisis.

El índice de correlación de Pearson tiene un intervalo de variación entre $[-1, +1]$. Un valor de $r = 1$, significa que la correlación entre las variables analizadas es positiva y perfecta; o sea, si una variable aumenta, la otra lo hace proporcionalmente. Un valor de $r = -1$ supone una correlación perfecta pero negativa. Es decir, al aumentar una variable, la otra disminuye proporcionalmente. Un coeficiente de correlación igual a cero indica que no existe relación lineal entre las dos variables. En nuestro análisis se puede observar que siempre que analizamos dos variables dadas se obtiene un valor del coeficiente de correlación "r" igual a $0 < r < 1$, lo que significa que la correlación es positiva. Eso significa, de forma general, que cuando aumenta el valor de una variable, aumenta también el valor de la otra. En el caso que a nosotros más nos interesa, si la agresividad del conjunto de aislados aumenta sobre un huésped, también lo hace sobre otro. No obstante, los valores de correlación detectados varían mucho dependiendo de las variables consideradas.

En primer lugar, la correlación entre crecimiento saprofito y agresividad sobre los huéspedes analizados es siempre baja ($< 0,4$). Sólo muestra valores de correlación moderados ($0,4 < r < 0,6$) en el caso de la judía, huésped sobre el que ahora alcanza un valor de 0,541. Este valor es ligeramente inferior al obtenido en nuestro análisis previo cuando se han considerado todos los aislados que han sido probados sobre judía (ver sección 2.2) y es consecuencia de la selección particular de aislados considerados en esta ocasión.

Comparando la agresividad sobre huéspedes distintos es posible comprobar que existe una correlación alta (0,699) entre judía y tomate. El comportamiento (es decir, la respuesta ante el conjunto de aislados analizados) de estos dos huéspedes parece ser más uniforme que cuando se analiza cada uno de ellos en relación con cualquiera de las variedades de vid (siempre se detectan coeficientes de correlación inferiores).

El coeficiente de correlación que se detecta entre las variedades de vid, ya sean blancas o tintas, es siempre alto, y siempre mayor que el observado cuando se analiza cada variedad de vid tanto con judía como con tomate. Por lo tanto, las variedades de vid muestran un comportamiento más uniforme y ciertamente constituyen un grupo de "huéspedes" diferente del que integran la judía y el tomate. No obstante, entre las variedades de vid es posible establecer dos grupos. Es interesante destacar que el coeficiente de correlación observado

cuando se comparan entre sí variedades tintas es siempre muy alto ($> 0,8$). Esto es particularmente evidente entre las variedades Tempranillo y Tinta de Toro ($r = 0,931$), lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta que ambas variedades, aunque con distinto nombre, representan a la misma variedad. Lo mismo sucede cuando consideramos el comportamiento de las variedades blancas. El coeficiente de correlación en todas las combinaciones entre variedades blancas es muy alto o alto. La correlación entre una variedad tinta y una variedad blanca, aunque alto, es generalmente menor que cuando se consideran dos variedades tintas o dos variedades blancas.

Finalmente, la correlación observada entre la agresividad sobre cualquier variedad de vid, tinta o blanca, con la agresividad sobre judía o sobre con tomate, es moderada o alta, pero siempre es más alta sobre judía que sobre tomate. Podemos deducir, por lo tanto, que a la hora de utilizar un huésped alternativo a la vid que nos permita valorar y predecir el comportamiento que tendrá un aislado o un grupo de aislados sobre la propia vid, la judía es un mejor predictor.

Tabla 14. Valores del coeficiente de correlación de Pearson ("r") obtenidos cuando se analizan por parejas las agresividades sobre cada uno de los huéspedes analizados (estimada en cada caso como el diámetro medio de lesión dispersiva generada). Se incluye también como variable la capacidad de crecimiento saprofito, estimada como la media del diámetro de la colonia en medio sintético MEA.

	Media Lesión Garnacha	Media Lesión Prieto Picudo	Media Lesión Tempranillo	Media Lesión Tinta de Toro	Media Lesión Verdejo	Media Lesión Albillo Real	Media Lesión Albillo Mayor	Media Lesión Crecimiento Saprofitico	Media Lesión Judía 2009	Medio Lesión Tomate
Media Lesión Garnacha	1	,838** ,000	,870** ,000	,849** ,000	,677** ,000	,761** ,000	,789** ,000	,329* ,047	,669** ,000	,561** ,000
Media Lesión Prieto Picudo		1	,851** ,000	,849** ,000	,667** ,000	,718** ,000	,746** ,000	,257 ,125	,573** ,000	,474** ,003
Media Lesión Tempranillo			1	,931** ,000	,663** ,000	,754** ,000	,838** ,000	,418* ,010	,739** ,000	,526** ,001
Media Lesión Tinta de Toro				1	,685** ,000	,786** ,000	,843** ,000	,361* ,028	,675** ,000	,581** ,000
Media Lesión Verdejo					1	,851** ,000	,789** ,000	,007 ,966	,414* ,011	,392* ,017
Media Lesión Albillo Real						1	,826** ,000	,086 ,612	,576** ,000	,661** ,000
Media Lesión Albillo Mayor							1	,240 ,153	,648** ,000	,540** ,001
Media Lesión Crecimiento Saprofitico								1	,506** ,001	,290 ,081
Media Lesión Judía 2009									1	,675** ,000
Medio Lesión Tomate										1
	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37

3 - GENÉTICA DE POBLACIONES Y DIVERSIDAD GENÉTICA

3.1 – AFLP

Para evaluar la diversidad genética existente en las poblaciones de *B. cinerea* de nuestros viñedos y para tratar de determinar el modo en el que esta variabilidad se estructura en las mismas decidimos utilizar procedimientos que permiten detectar polimorfismos nucleotídicos basados en la generación de perfiles de marcadores moleculares de tipo AFLP (Vos *et al.*, 1995). Elegimos esta metodología porque permite detectar gran cantidad de variación ya que es posible obtener perfiles complejos de marcadores moleculares lo que permite, a su vez, evaluar simultáneamente numerosos marcadores moleculares en cada individuo analizado.

Los procedimientos experimentales mediante los cuales se generan perfiles de marcadores moleculares de tipo AFLP son procedimientos complejos basados en la utilización de enzimas de restricción y de ligación y en reacciones de PCR que hacen uso de combinaciones específicas de oligonucleótidos que requieren una inversión importante de recursos (económicos y de ejecución) y una experiencia técnica considerable. No obstante, son procedimientos que pueden estandarizarse y, al menos en parte, automatizarse, facilitando el análisis de poblaciones numerosas de individuos. De forma esquemática estos procedimientos suponen:



Los métodos y los procedimientos correspondientes, así como las condiciones particulares utilizadas en cada fase, son los descritos en la sección de Materiales y Métodos.

3.1.1 – OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.1.1.1 - COMBINACIONES DE CEBADORES

Antes de aplicar el procedimiento experimental que permite generar perfiles de marcadores moleculares tipo AFLP a toda nuestra colección de aislados, consideramos apropiado determinar las condiciones experimentales más adecuadas en nuestro sistema (tipos de cebadores y combinaciones particulares de cebadores) utilizando inicialmente un número reducido de aislados con los que se determinaría la validez de los procedimientos generales que habrían de ser aplicados, desde la obtención de ADN genómico de calidad hasta la separación de los fragmentos de amplificación mediante electroforesis capilar, considerando las posibles modificaciones que fuera necesario introducir para optimizar los resultados en nuestro sistema.

Este análisis se ha llevado a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, en la finca Zamadueñas, Valladolid, dependiente de la Junta de Castilla y León, concretamente en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto y contando con la colaboración de la Doctora Doña Marta Hernández y de Doña Raquel Guijarro. En este centro han adquirido una experiencia muy notable en el manejo del sistema, particularmente aplicado al análisis de genomas de plantas, y mantienen los equipos en funcionamiento de manera rutinaria. En la aplicación de estos procedimientos utilizan el sistema "AFLP Plant Mapping" de Applied Biosystems siguiendo esencialmente los protocolos descritos en el manual que proporciona la casa comercial. En el laboratorio de Biología Molecular del ITACyL disponen de una batería de oligonucleótidos *EcoRI* marcados con FAM y extendidos con 2 nucleótidos y una batería de oligonucleótidos *MseI* extendidos con 3 nucleótidos que permiten chequear inicialmente una serie de muestras de cada sistema en particular con un buen número de combinaciones de cebadores de amplificación selectiva para determinar aquellas combinaciones que resultan más informativas en un sistema dado.

El fundamento de los procedimientos que se aplican para llevar a cabo la detección de marcadores moleculares de tipo AFLP ha sido descrito de manera resumida en la sección de Materiales y Métodos. Para facilitar el seguimiento de los análisis realizados para optimizar nuestro sistema presentamos la Figura 26. La utilización del Kit suministrado por Applied Biosystems facilita enormemente la aplicación del procedimiento a un número elevado de muestras (de individuos). Como cabe deducir de la consideración de las fases del procedimiento descritas en la Figura 26, las fases 1 (de digestión de las muestras de ADN genómico) y 2 (de ligación de los adaptadores) son fases con procedimientos muy estandarizados que se aplican directamente en cualquier sistema sin necesidad de considerar particulares modificaciones. La fase tres, de amplificación preselectiva, hace uso de una mezcla de un oligonucleótido *EcoRI*+A y de un nucleótido *MseI*+C (la denominada "preselective primer mix") comercial, que funciona muy bien de manera general generando la primera subdivisión de la población de fragmentos de restricción que serán luego utilizados en las

reacciones de amplificación selectiva. En esta fase no cabe considerar introducir modificaciones. Es en la fase 4, de amplificación selectiva, en la que se hace necesario probar diversas combinaciones de cebadores *EcoRI* marcados con FAM y de cebadores *MseI*, extendidos con 2 o 3 nucleótidos adicionales cada uno de ellos, para determinar, en función de las características del genoma de la especie de trabajo, aquellas combinaciones que generan patrones de marcadores moleculares más informativos.

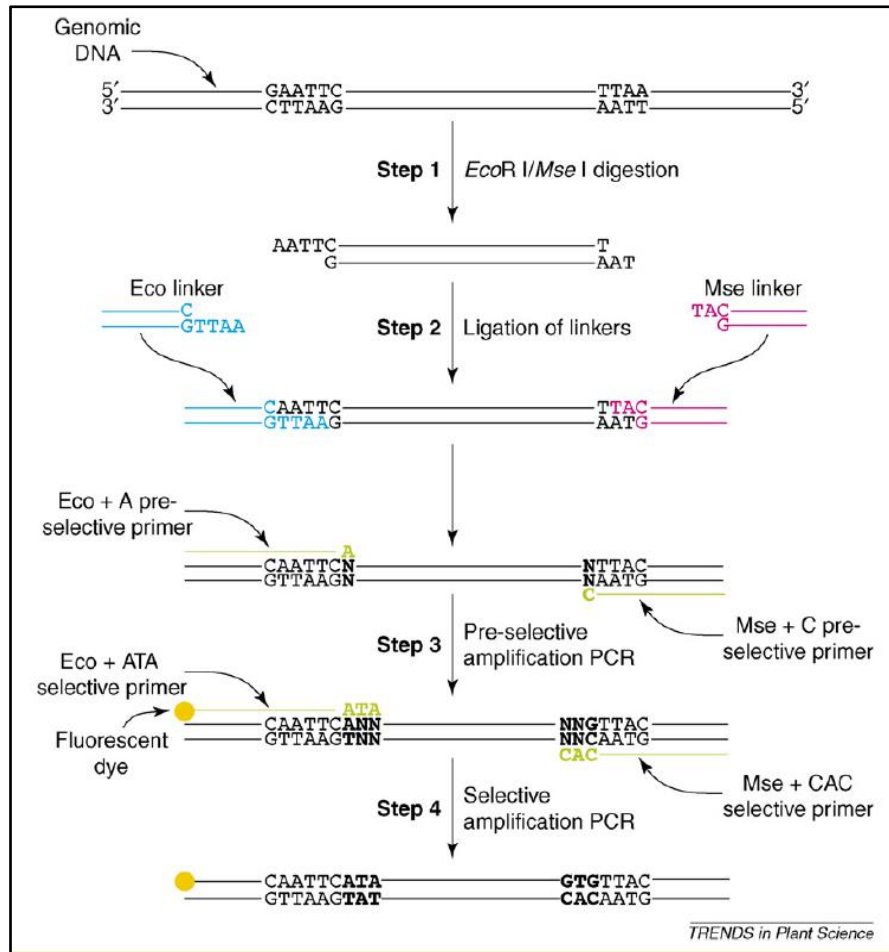


Figura 26. Esquema simplificado de las fases que se siguen en la detección de marcadores moleculares de tipo AFLP.

En nuestro sistema, en una primera serie de experimentos llevamos a cabo el análisis completo con dos muestras de ADN de dos aislados diferentes probadas con la mezcla de cebadores preselectiva comercial y con un total de 16 combinaciones selectivas diferentes de oligonucleótidos *EcoRI* marcados con FAM y de oligonucleótidos *MseI*: Los oligonucleótidos *EcoRI* marcados con FAM tenían una extensión de 2 nucleótidos adicionales en su extremo 3' y los oligonucleótidos *MseI* tenían una extensión adicional de 3 nucleótidos en su extremo 3' (esta configuración de los oligonucleótidos es la utilizada más frecuentemente para el análisis de genomas de especies de plantas, - las especies con las que más habitualmente se trabaja

en el ITACyL aplicando estas herramientas de análisis - y cuyo tamaño, generalmente grande, hace necesario trabajar con nucleótidos *Msel* con tres nucleótidos adicionales para reducir el tamaño -número de fragmentos- de la subpoblación de fragmentos de restricción amplificados en cada reacción de PCR selectiva de forma que resulte factible generar un patrón de bandas susceptible de ser resuelto mediante electroforesis).

Los mejores resultados, en este caso resolviendo los fragmentos amplificados en un gel de acrilamida en electroforesis vertical, se obtuvieron con las combinaciones de oligonucleótidos que incluían el oligonucleótido *EcoRI* (FAM)+AC y los oligonucleótidos *Msel*+CCC, *Msel*+CGG, *Msel*+CAA y *Msel*+CTT. El genoma de *B. cinerea* es pequeño (38 Mb) en comparación con el genoma de plantas (500 Mb – *Vitis vinifera*, 1115 Mb – *Glycine max*, 2400 Mb – *Zea mays*, etc., (NCBI – Entrez Genome Project)). En nuestro caso, entonces, es lógico esperar que la utilización de oligonucleótidos selectivos con una extensión de 3 nucleótidos determine una reducción importante del tamaño de la población de fragmentos finalmente amplificados en cada reacción de amplificación selectiva, perdiendo información potencialmente interesante. Por esta razón decidimos llevar a cabo sobre las dos muestras de ADN genómico utilizadas anteriormente, las mismas reacciones de amplificación selectiva pero utilizando los oligonucleótidos *Msel* equivalentes a los utilizados en el experimento anterior pero que no incluían el último nucleótido adicional en 3'. Trabajamos así, por una parte con los cebadores utilizados anteriormente y, por otra, con el cebador *EcoRI* FAM+2 (– AC) en combinación con los cebadores *Msel*+2 (– CC, – CG, – CA y – CT). Los productos de amplificación de unas reacciones y otras fueron ahora resueltos mediante electroforesis capilar y los electroferogramas generados fueron adquiridos y analizados con ayuda del software GeneMapper.

La comparación de los electroferogramas obtenidos demostró que no variaba cuantitativamente de la manera esperada el número de bandas detectadas cuando se utilizaban oligonucleótidos *Msel*+2 nt en lugar de oligonucleótidos *Msel*+3 nt (se esperaban del orden de tres o cuatro veces más bandas con los oligonucleótidos +2 en comparación con los oligonucleótidos +3), si bien es posible concluir que siempre se obtenían más bandas con los oligonucleótidos +2, generando perfiles más informativos. La electroforesis capilar proporcionó, además, una capacidad de resolución mucho más importante que la electroforesis vertical, como era de esperar. En las condiciones experimentales utilizadas era posible detectar de forma rutinaria electroferogramas con patrones que incluían entre 30 y 60 bandas con cada combinación particular de cebadores. De las cuatro combinaciones de cebadores probadas, y fruto del análisis de los electroferogramas obtenidos con las dos muestras de ADN genómico utilizadas derivadas de dos aislados de campo diferentes, decidimos trabajar con tres combinaciones, aquellas que incluían el oligonucleótido *EcoRI* FAM +2 (–AC) con cada uno de los tres cebadores *Msel* +2 (– CA, – CC, – CG). Estas tres combinaciones eran las que presentaron patrones de marcadores con un mayor número de bandas polimórficas entre las dos cepas evaluadas inicialmente.

3.1.1.2 - CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PICOS Y REPRODUCIBILIDAD

Una vez determinadas en una primera fase de optimización de las condiciones experimentales de nuestro análisis las combinaciones de cebadores que iban a ser utilizadas en nuestro sistema y una vez comprobado que con nuestras muestras de ADN estas combinaciones de cebadores permitían generar electroferogramas con una calidad general apropiada, abordamos entonces una segunda fase en la optimización del sistema, fase en la que pretendíamos fijar los criterios de calidad que debían cumplir los picos de los electroferogramas que habrían de ser seleccionados y utilizados en nuestro análisis de diversidad genética. Puesto que en una tercera fase de la optimización del sistema experimental nos proponíamos abordar el problema de la reproducibilidad de los electroferogramas obtenidos, decidimos llevar a cabo el estudio de las características de los picos seleccionados trabajando con una serie amplia de electroferogramas generados a partir de muestras duplicadas de ADN genómico de una selección de aislados representativa de la colección de estudio. Estas muestras serían preparadas en cada caso a partir de dos muestras de micelio distintas obtenidas de cultivos diferentes de un mismo aislado (réplicas biológicas) y serían probadas con las tres combinaciones de cebadores determinadas anteriormente como más adecuadas. Se seleccionaron en total 26 aislados que representan aproximadamente un 10% de la población total analizada. Fueron concretamente los aislados siguientes: 328, 351, 355, 407, 409, 477, 532, 533, 552, 598, 617, 620, 629, 631, 632, 633, 26, 175a, 177, 178, 180, 188b, UCA001, UCA156, Bd90 y EB05.10.

Con estas 52 muestras de ADN se generaron 156 electroferogramas (52 muestras x 3 combinaciones de cebadores por muestra). Los electroferogramas son generados de forma automatizada. Recordamos brevemente que el proceso supone que después de la amplificación selectiva, las poblaciones de fragmentos de ADN amplificados son desnaturalizadas y separadas mediante electroforesis capilar. Los fragmentos son posteriormente detectados gracias a la emisión de fluorescencia del fluoróforo que incorpora el oligonucleótido *EcoRI* marcado. En nuestro caso particular la electroforesis capilar y la detección de los fragmentos se llevó a cabo en un equipo de secuenciación automático modelo 310 de Applied Biosystems. Con la ayuda del programa GeneMapper, y haciendo uso de un marcador de tamaño interno que se incluye en cada muestra para la electroforesis, es posible generar electroferogramas característicos de cada tipo de ADN y con cada combinación particular de cebadores, electroferogramas que incluyen para cada pico información sobre su posición exacta (tamaño del fragmento), la dimensión de su base y su altura (medida en función de la intensidad de la fluorescencia y que constituye una medida directa de la cantidad de producto amplificado). El programa está configurado de forma que genera el electroferograma correspondiente en cada caso de forma automatizada con los parámetros por defecto y, disponiendo de una serie de electroferogramas, extrae a partir de los mismos información sobre la presencia o ausencia de cada pico en todos los electroferogramas

incluidos en el análisis, generando finalmente una matriz binaria que constituye el material base para todo el trabajo posterior.

La experiencia acumulada por numerosos grupos de investigación indica que el sistema automatizado incorpora en la matriz binaria numerosos errores, aun cuando el sistema ha sido optimizado y los parámetros han sido fijados con criterios muy estrictos. Se hace necesario inevitablemente un análisis visual detallado de todos los electroferogramas. Y así procedimos en nuestro caso.

Inicialmente los electroferogramas fueron inspeccionados para determinar si el nivel general de amplificación de productos era suficiente (o no) como para producir picos susceptibles de ser analizados y que en conjunto configuraban perfiles de amplificación reproducibles. La Figura 27 muestra un electroferograma con una amplificación general pobre, en comparación con un electroferograma derivado de un procedimiento experimental satisfactorio. En estos casos el electroferograma inicial fue descartado del análisis y el procedimiento experimental repetido desde un principio a partir de la misma muestra de ADN. En caso de repetirse el problema, la muestra de ADN era descartada y se repetía el análisis partiendo de una nueva extracción de ADN.

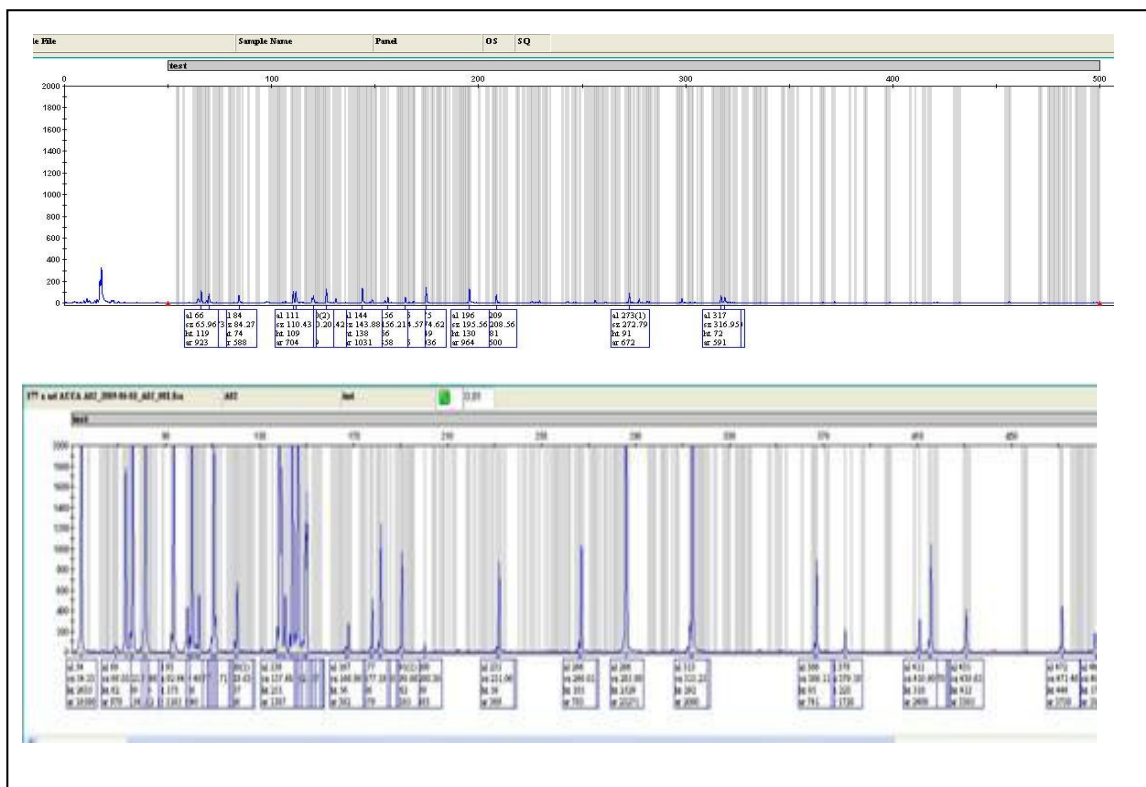


Figura 27. Ejemplo de electroferograma de pobre calidad general, presentado en la parte superior de la figura, en comparación con un electroferograma de calidad y susceptible de ser analizado, presentado en la parte inferior.

Posteriormente cada electroferograma fue revisado manualmente pico a pico. Los criterios para seleccionar los picos analizados (altura, intensidad del pico, tamaño de la banda) se basaron en las descripciones realizadas por distintos autores para descartar picos y/o perfiles completos con baja calidad (Rinehart, 2004; Bonin *et al.*, 2004; Bonin *et al.*, 2005; Meudt and Clarke, 2007; Liljander *et al.*, 2009; Pompanon *et al.*, 2005; Wooten and Tolley-Jordan, 2009). En particular Rinehart (2004) recomienda trabajar con picos correspondientes a fragmentos de ADN de tamaño entre 50 y 500 bp, y este es el rango de tamaños que hemos manejado en nuestro trabajo. Recomienda, asimismo, seleccionar para el análisis únicamente aquellos picos que tienen una intensidad superior a 100 rfu (unidad relativa de fluorescencia). Bonin *et al.*, (2005) proponen, además, que deben ser descartados en el análisis aquellos picos que se solapan en mayor o menor medida. En la Figura 28 se muestra parte de un electroferograma en el que aparecen al menos dos ejemplos del efecto denominado "pico doble" que ilustra esta situación y que probablemente son consecuencia de la combinación de cebadores utilizada. Según Bonin *et al.*, (2005), los picos seleccionados deben mostrar una diferencia de tamaño de al menos 1 nt y se deben evitar siempre los picos que muestren cierto grado de solapamiento.

Seguimos la publicación de Rinehart (2004) para elegir los parámetros de selección de los picos válidos en nuestro análisis como altura - intensidad del pico: (100 rfu - unidad relativa de fluorescencia) y tamaño de la banda (entre 50 y 500 bp). También seguimos esa publicación para configurar los otros parámetros en el programa GeneMapper (ya que ese programa está configurado por defecto para microsatélites).

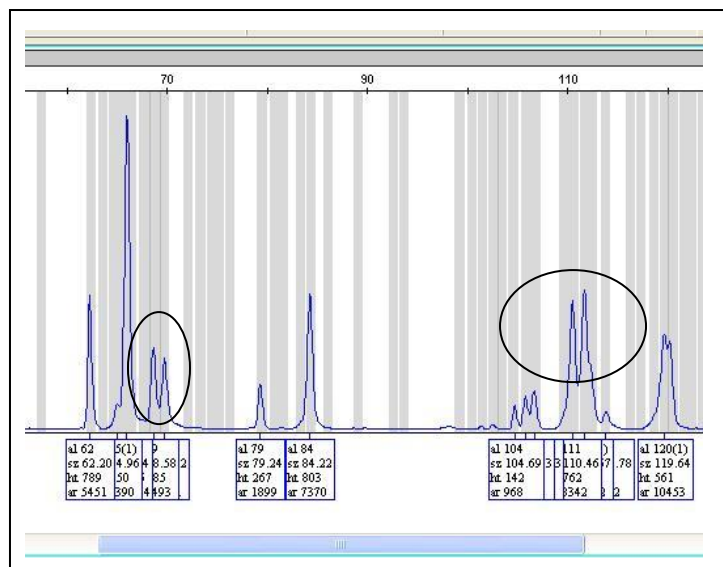


Figura 28. Ejemplos de pico doble (un defecto) que no deben ser considerados en la matriz final.

Establecidos los criterios de selección y disponiendo de los electroferogramas correspondientes de los 26 aislados considerados inicialmente y por duplicado abordamos el

problema de la reproducibilidad de los patrones de picos obtenidos. En cada caso, es decir, para cada aislado dado, los electroferogramas obtenidos con cada combinación de cebadores con las dos muestras de ADN correspondientes fueron analizados y comparados en detalle. La Figura 29 muestra una representación de la misma región en dos electroferogramas obtenidos con las dos muestras de ADN del aislado 177 procesados con la combinación de cebadores *EcoRI* – AC y *MseI* - CA. Una inspección visual de los mismos demuestra una absoluta coincidencia en los perfiles de picos de una y otra amplificación y una similitud también muy notable en el grado de amplificación de los distintos productos detectados en ambos casos. Y esta similitud resultó también obvia a lo largo de toda la región del electroferograma considerada en el análisis.

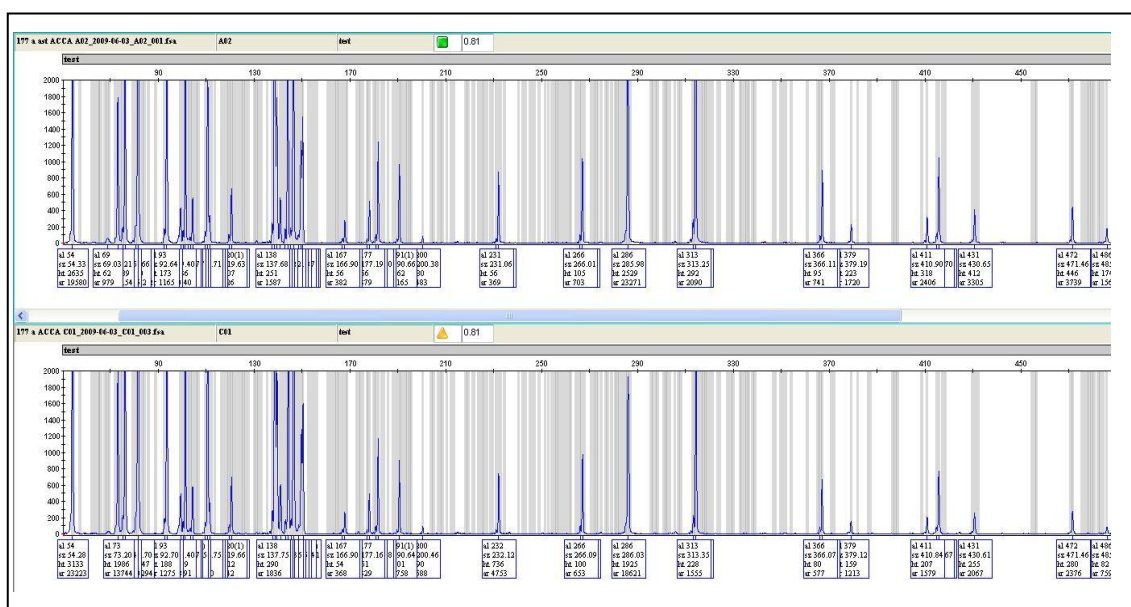


Figura 29. Ejemplo de reproducibilidad de la metodología utilizada para generar AFLPs. Se presentan dos perfiles electroforéticos resultantes del análisis de AFLPs obtenidos con el aislado 177a a partir de dos extracciones de ADN distintas.

Esta situación fue general cuando se analizaron todos los electroferogramas de los 26 aislados por duplicado y con las tres combinaciones de cebadores. Los perfiles resultaron ser esencialmente idénticos entre las muestras que constituyen una réplica. Cuando se compararon los perfiles de aislados diferentes fue posible detectar diferencias, es decir polimorfismos, si bien el perfil general resultó ser también en este caso, como era de esperar, muy similar. La Figura 30 ilustra esta situación. En ella se muestran dos electroferogramas correspondientes a dos muestras de ADN derivadas del aislado UCA001 y un electroferograma derivado de una muestra del ADN de un aislado diferente, en este caso el aislado Bd90. Mientras que los electroferogramas superior y central son idénticos, es posible detectar alguna diferencia en los perfiles cuando se comparan estos dos electroferogramas con el tercero, presentado en la parte inferior de la figura.

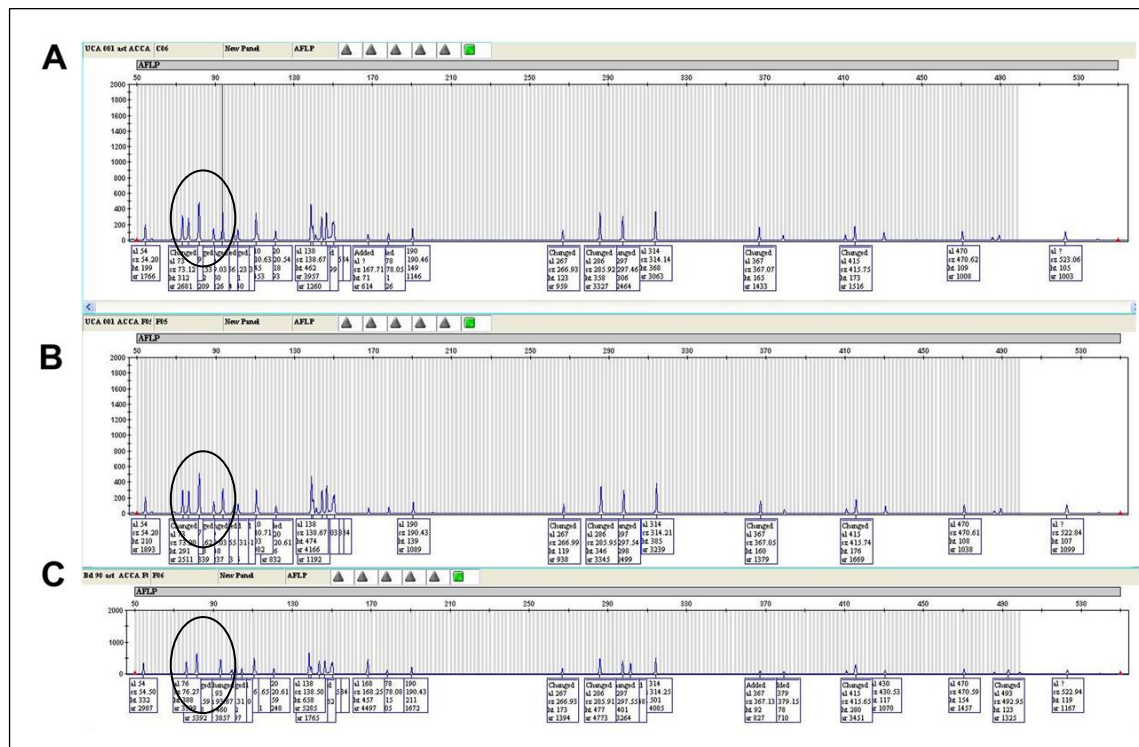


Figura 30. Reproducibilidad del análisis de ADN con AFLPs en la comparación llevada a cabo con dos muestras de ADN del mismo aislado (A y B - UCA001) y la muestra de ADN de un aislado diferente (C - Bd90).

Aunque la inspección visual que se llevó a cabo indicaba que el sistema es consistente y que genera perfiles reproducibles, es necesario tratar de cuantificar en qué medida el sistema es efectivamente reproducible a escala global. Con este objeto se analizaron los electroferogramas obtenidos sobre las 52 muestras de ADN con cada combinación de cebadores y siguiendo los criterios de selección descritos en esta sección se extrajeron los picos que respondían a los mismos y se generó la matriz de presencia/ausencia de picos (marcadores) en el conjunto de aislados analizados. En el caso de la combinación de cebadores *EcoRI-AC/MseI-CA* resultaron seleccionados un total de 128 picos (marcadores). A partir de esta matriz se calculó, siguiendo los procedimientos indicados en la sección siguiente, el coeficiente de similitud de Dice de cada aislado con su réplica y con todos los demás aislados. La Tabla 15 presenta los valores de los coeficientes de similitud de cada aislado con su réplica. Se comprueba que en 18 de los 26 aislados el coeficiente de similitud obtenido es igual a 1 y que en 25 de los 26 el coeficiente de similitud entre réplicas es superior al 97%. Sólo en el caso del aislado 552 este coeficiente es ligeramente inferior (0,9677). El valor medio de similitud entre réplicas para estos aislados resultó ser de 0,9947. Son valores de similitud ciertamente elevados que apuntan a que la reproducibilidad de nuestro sistema es prácticamente absoluta. Según Bonin *et al.*, 2005, en una revisión bibliográfica, la reproducibilidad de los AFLP en invertebrados fue superior a 95%. En el trabajo de Zeid *et al.*,

(2003), se obtuvo un coeficiente mínimo de Nei y Li, similar a Dice, igual a 0,83 y un máximo igual a 0.88, siendo el valor de la media igual a 0,86.

Tabla 15. Valores de similitud entre los dos miembros de cada réplica biológica ("a" y "b") para los 26 aislados analizados en el ensayo de reproducibilidad. La tabla presenta para cada aislado el valor del coeficiente de similitud de Dice de cada individuo con su réplica.

328ab	351ab	355ab	407ab	409ab	477ab	532ab	533ab	552ab	598ab
1	1	0,9767	1	1	0,9882	0,9873	1	0,9677	1
617ab	620ab	629ab	631ab	632ab	633ab	26ab	175ab	177ab	180ab
1	1	1	0,9877	1	1	0,988	1	1	1
188ab	Ebab	UCA1ab	U156ab	Bdab	178ab				
0,9787	1	1	1	1	0,9885				

Con los coeficientes de similitud determinados entre todos los aislados e incluyendo las réplicas se llevó a cabo un análisis de agrupamientos construyendo el dendograma UPGMA correspondiente, que se presenta en la Figura 31. Este dendograma muestra que cada aislado presenta en todos los casos la máxima similitud con su réplica y que, por lo tanto, se generaría el mismo dendograma cualquiera que fuera la réplica de un aislado dado utilizada para realizar el análisis de agrupamientos. Como se comprueba en la figura, sólo las dos réplicas del aislado 552 muestran un coeficiente de similitud inferior (y en muy pequeña medida) al límite de similitud propuesto como aceptable (0,97).

¿Por qué planteamos este valor de coeficiente de similitud "límite"? Es necesario explicar en este momento que como veremos en la sección "3.2 de Resultados", para llevar a cabo los análisis de diversidad genética que planteamos en este estudio es necesario identificar los posibles clones que puedan estar presentes en la población de trabajo y, una vez identificados, seleccionar un único representante de cada tipo, es decir un representante de cada "haplotipo". Siguiendo las indicaciones planteadas por Bentley *et al.*, (2009) este límite de similitud con frecuencia se fija en un valor de 0,97. Es decir, aquellos aislados con un coeficiente de similitud superior a 0,97 serán considerados "clones" y se seleccionará para estudios posteriores un representante de cada tipo clonal. Consideramos, entonces, que en un sistema experimental con unas características como las que estamos determinando y con una reproducibilidad que genera unos índices de similitud como los que hemos determinado no es necesario llevar a cabo por duplicado todo el análisis de todos los aislados objeto de estudio, como se ha propuesto con frecuencia en sistemas experimentales en los que la reproducibilidad se ha demostrado que es inferior. Con los niveles de reproducibilidad detectados en nuestro sistema creemos que las distorsiones que pudieran producirse en nuestros análisis como consecuencia de la incorporación de marcadores generados o identificados de forma errónea en cualquier fase del proceso experimental están por debajo del valor límite de diferencias que vamos a tomar en cuenta para considerar que dos individuos son clones.

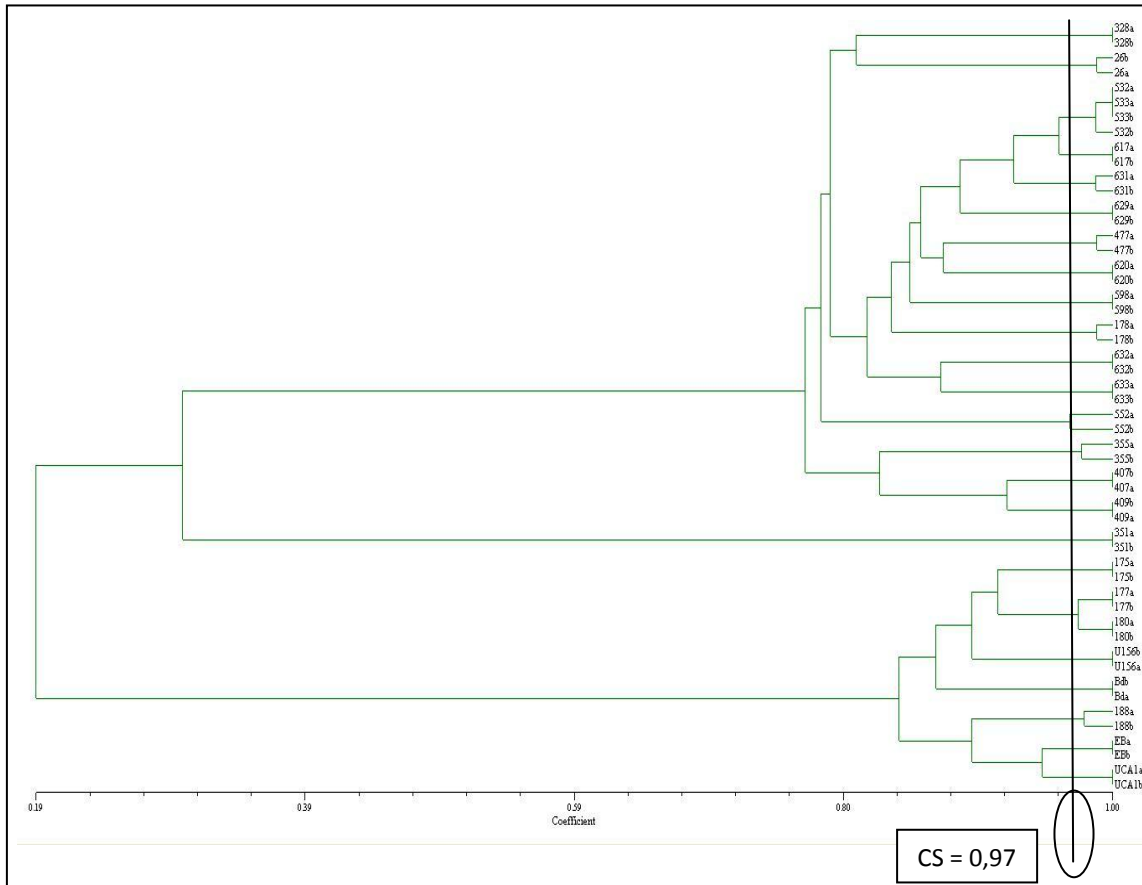


Figura 31. Dendrograma UPGMA construido a partir de los coeficientes de similitud entre 26 aislados de *B. cinerea* y sus correspondientes réplicas obtenidos con la matriz binaria derivada de los electroferogramas generados con los cebadores *EcoRI-AC/MseI-CA*.

El análisis realizado con los electroferogramas derivados de las amplificaciones llevadas a cabo con todas las muestras de ADN con las otras dos combinaciones de cebadores ofrecieron resultados muy similares que confirman la reproducibilidad y la consistencia de nuestro sistema, haciendo innecesaria la realización de réplicas con todos los aislados.

3.2 - ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

3.2.1 – DESCRIPCIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE DATOS

Se partió inicialmente de los 316 aislados de *B. cinerea* seleccionados para la caracterización fisiológica y molecular (una vez excluido el aislado de *B. aclada* incluido en el análisis fisiológico). Las muestras de ADN genómico utilizadas para el análisis de AFLPs fueron las mismas que se utilizaron para la amplificación de los marcadores tipo SCAR considerados en este trabajo y para el análisis de transposones. Una vez obtenidos, analizados y depurados todos los electroferogramas generados, pudimos comprobar que con 291 muestras de ADN genómico, derivadas de otros tantos aislados, fue posible obtener perfiles de AFLPs de calidad apropiada para su análisis. Con muestras de ADN de 25 aislados no resultó posible obtener perfiles de calidad adecuada con las tres combinaciones de cebadores analizadas. Por esta razón, estos 25 aislados fueron descartados del análisis molecular.

Con los electroferogramas obtenidos con el conjunto de individuos con cada combinación de cebadores se generó una matriz de datos binarios. Posteriormente, las tres matrices generadas fueron combinadas en una única matriz general que incluía, para los 291 individuos considerados, todos los marcadores seleccionados teniendo en cuenta los criterios indicados anteriormente. Procedimos entonces a eliminar los marcadores con una frecuencia menor que 1%, que son considerados raros, obteniendo así una matriz con un total de 388 marcadores en un rango de tamaños de 50 a 500-bp. La combinación *EcoRI* +AC y *MseI* +CA generó 161 marcadores, la combinación *EcoRI* +AC y *MseI* +CC, 105 marcadores y la combinación *EcoRI* +AC y *MseI* +CG generó 122 marcadores.

Bentley y colaboradores sugieren que la matriz final, aquella que será utilizada para generar todos los datos de variabilidad genética en la población de individuos objeto de estudio, debe incluir únicamente aquellos marcadores cuya frecuencia es $5\% < f < 95\%$, para evitar problemas como homoplasia (Bentley *et al.*, 2008). Por esta razón, y siguiendo a estos autores, eliminamos todos los marcadores con una frecuencia menor que 5% y los marcadores con una frecuencia mayor que 95%.

3.2.2 – ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

El objetivo principal de nuestro trabajo es cuantificar la diversidad genética existente en las poblaciones naturales de *B. cinerea* recogidas en nuestros viñedos y determinar si existe algún tipo de estructura genética en las mismas (y, en su caso, considerar qué tipo de factor condiciona esa estructuración). Nuestro interés se centra en las Denominaciones de Origen de producción de vino en Castilla y León como unidades operacionales, dado que las prácticas culturales y de manejo que impone esta figura administrativa pueden condicionar la forma en la que la variabilidad genética se estructura en la naturaleza. Por esta razón, la consideración de

la estructura de la población en función de las D.O. constituye la situación de partida en nuestro análisis. Para determinar si existe estructura genética decidimos analizar la diversidad genética en la población en su conjunto y en la población dividida en subpoblaciones establecidas en función de las D.O. estudiadas. Posteriormente, la población será analizada considerando su posible subdivisión en función de otros dos criterios; la variedad de uva a partir de la cual los aislados fueron obtenidos y el año de aislamiento.

Para llevar a cabo esta cuantificación se trabajó con la matriz de datos binarios descrita en la sección 3.2.1., construida con los 291 individuos seleccionados considerando un total de 388 marcadores dominantes. En esta matriz fueron eliminados todos los marcadores con frecuencias superiores a 0,95 e inferiores a 0,05. Utilizando la matriz derivada, y con las restricciones (consideraciones) que describiremos en la siguiente sección, decidimos estimar los parámetros de diversidad genética en la población global y en las poblaciones correspondientes a las distintas D.O. Los parámetros considerados, los más utilizados cuando se manejan marcadores dominantes en poblaciones de organismos haploides, fueron: (1) el % de loci polimórficos, (2) la diversidad genética o heterocigosidad esperada (h) y (3) el número de haplotipos (frecuencias genotípicas).

La estimación de la diversidad genética (h) nos proporciona la información básica para calcular índices (H_S , H_T y G_{ST}) que nos informan una primera aproximación sobre la existencia o no de estructura genética de la población. Una fuente adicional de información se basa en el estudio de las relaciones genéticas entre individuos y entre poblaciones, derivadas a su vez del cálculo de los correspondientes coeficientes de similitud genética. En nuestro análisis ambas aproximaciones han sido tenidas en cuenta.

3.2.2.1 - RELACIONES GENÉTICAS ENTRE INDIVIDUOS

Las relaciones entre los aislados de *B. cinerea* fueron evaluadas mediante la construcción y análisis de dendogramas que se generan a partir de una matriz de similitudes genéticas entre individuos. Estas similitudes genéticas entre los aislados estudiados fueron determinadas mediante el cálculo del coeficiente de similitud (SC) (similarity coefficient) de DICE (Dice, 1945), estimado como SC entre cada dos aislados, "i" y "j", utilizando la fórmula presentada en la Figura 32 y haciendo uso del programa SIMQUAL (Qualitative Data) de NTSYS – pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.11 (Rohlf, 2002). En esta fórmula "a" representa el número de bandas que están presentes en ambos individuos ("i" y "j"), "b" representa el número de bandas ausentes en el individuo "i" y presentes en el individuo "j" y "c" representa el número de bandas presentes en el individuo "i" y ausentes en el individuo "j" (Bonin *et al.*, 2007).

$$SC_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Figura 32. Fórmula para el cálculo del coeficiente de similitud de DICE.

Con los datos derivados de la consideración de todas las combinaciones que se pueden establecer con todos los aislados tomados de dos en dos se generó una matriz de similitudes genéticas que fue utilizada para construir un dendrograma mediante el método de agrupamiento de pares de grupos ponderados con media aritmética (UPGMA) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) con el programa SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested clustering methods) del paquete de software NTSyS-pc 2.1. El dendrograma resultante se presenta en la Figura 33.

Los valores del coeficiente de similitud genética de Dice variaron entre un valor máximo de $CSD = 1,00$ – aislados 431A-5R x 430A-5R y 545A-7O x 544 A-7O - y un valor mínimo de $CSD = 0,0845$ – aislados 509A-8R x UCA001A-3. El dendrograma obtenido muestra una población en la que cabe distinguir un grupo de individuos muy reducido, integrado por 10 aislados, que resulta claramente diferente del gran grupo de individuos que conforman la población principal en su conjunto. Dentro del grupo de 10 aislados se integran: 1 aislado de la D.O. de Toro, 6 aislados de la D.O. Ribera del Duero y 3 aislados de la zona con Denominación Vinos de la Tierra Sierra de Salamanca, representando uno de estos tres aislados (el identificado con el código 577) una entidad genética marcadamente diferente. El resto de los individuos conforman una población relativamente uniforme, mostrando valores de similitud genética elevados. Entre estos individuos es posible detectar distintos niveles de agrupamiento que permiten llegar a identificar finalmente individuos con similitudes genéticas muy elevadas, que incluso alcanzan el valor de "1". Siguiendo las indicaciones realizadas por algunos autores y ya tenidas en cuenta en secciones previas de este trabajo (Bentley *et al.*, 2008), aquellos individuos que presentan valores del coeficiente de similitud iguales o superiores a 0,97 son considerados clones. En el dendrograma esta situación está indicada mediante elipses que engloban a los individuos que integran los agrupamientos que consideramos clones (Figura 33). En total se detectaron 14 grupos, 13 integrados cada uno por 2 individuos y 1 integrado por 3 individuos. Como se comprueba en el análisis del dendrograma, cada uno de estos grupos (con la única excepción del grupo que incluye a los aislados 126A-6R y 160A-5A) engloba aislados con números correlativos, o muy próximos, lo que indica que en cada caso se trata de aislados obtenidos a partir del mismo racimo (ver Tabla de aislados (Tabla 5) en esta sección de Resultados). Sin embargo, no en todos los casos en los que se han analizado aislados derivados del mismo racimo, éstos han mostrado similitudes genéticas que indiquen que son en realidad clones del mismo individuo. En total, además de un buen número de aislados únicos (derivados cada uno de un racimo diferente) se han manejado aislados derivados del mismo

racimo en un total de 131 racimos (aislados de 2007). De todos ellos, sólo en 14 casos los aislados analizados han resultado ser clones.

Es interesante destacar el caso de los aislados 126A-6R y 160A-5A, indicado anteriormente. Ambos aislados proceden de distintas D.O., de Rueda el aislado 126 y de Ribera del Duero el aislado 160, y fueron recogidos sobre variedades de vid diferentes, Tempranillo el aislado 126 y Albillo el aislado 160. Para estos aislados la cuantificación de la similitud genética entre ambos demuestra que son clones, lo que proporciona evidencias adicionales de la ocurrencia de reproducción clonal en las poblaciones naturales de *B. cinerea* en nuestros viñedos.

Es posible establecer distintos niveles de agrupamiento en la población principal, pero un análisis detallado de los mismos demuestra que no existe una tendencia de agrupamiento clara, ni por D.O. ni por variedad de uva. Los aislados utilizados como cepas de referencia en nuestro análisis fisiológico, y que constituyen cepas externas en nuestro análisis genético (los aislados EB05.10, T4, Bd90, UCA001, UCA156 y UCA206), ocupan posiciones internas y muy diferentes unas y otras, en el dendograma.

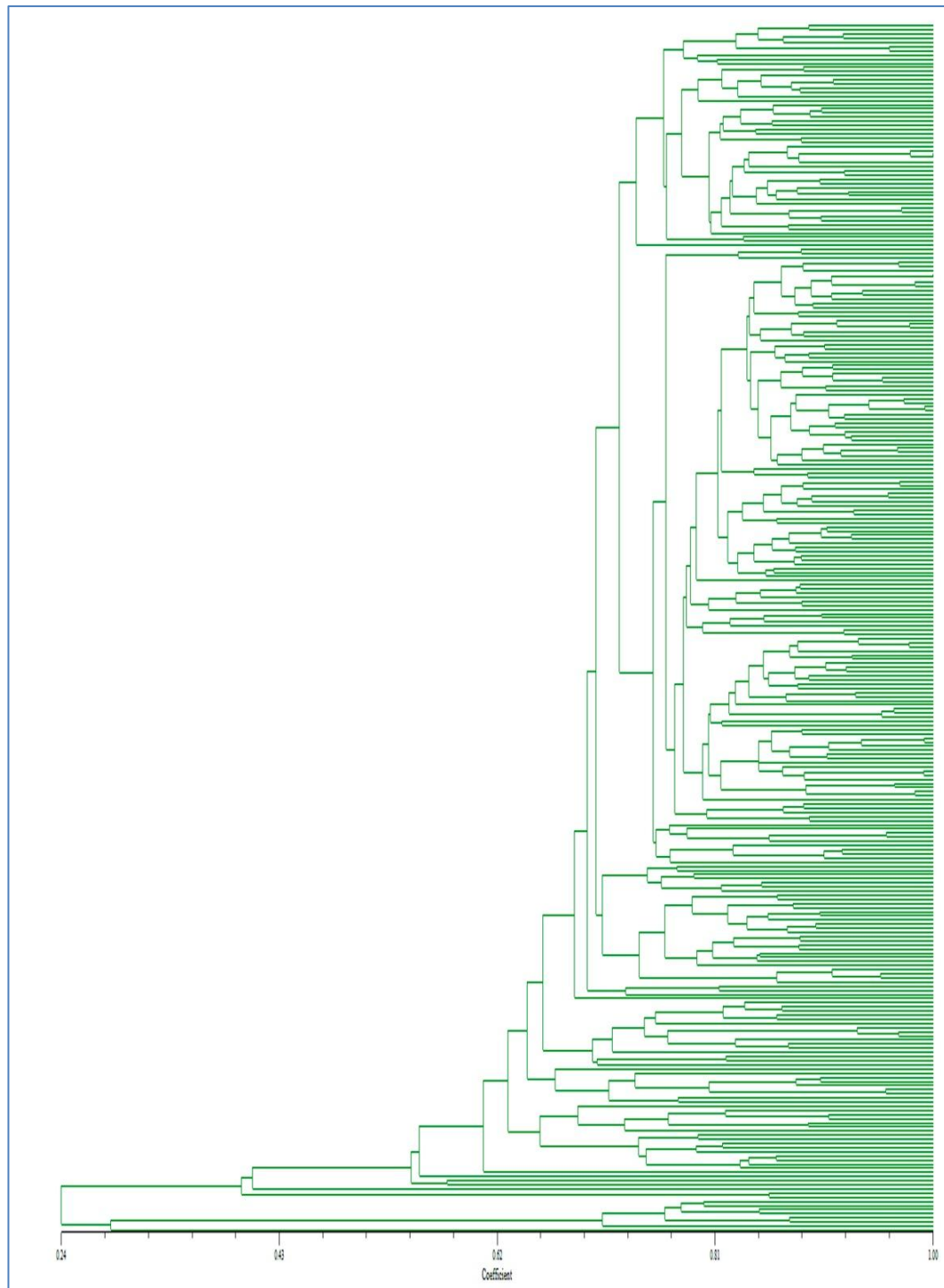
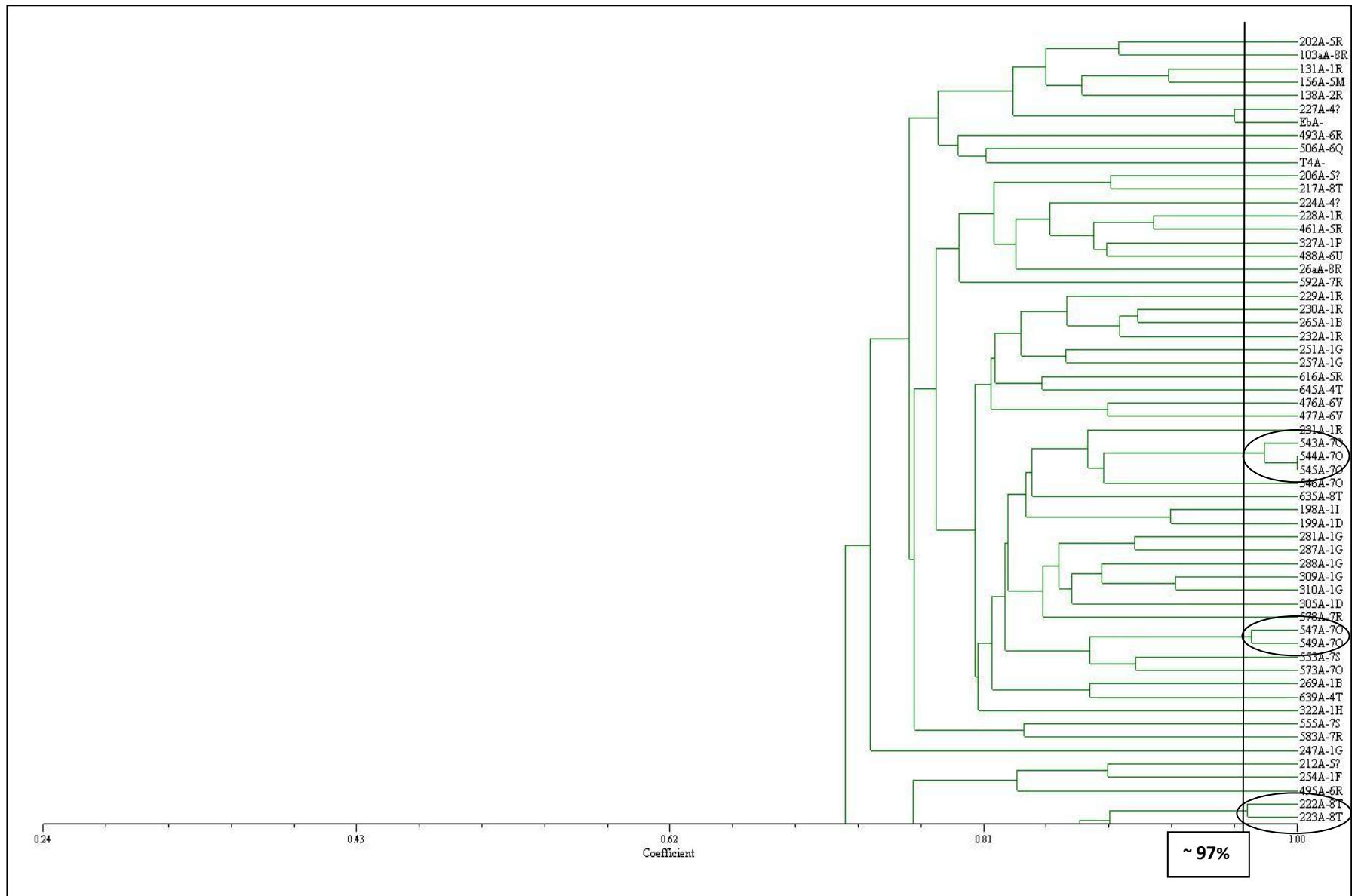
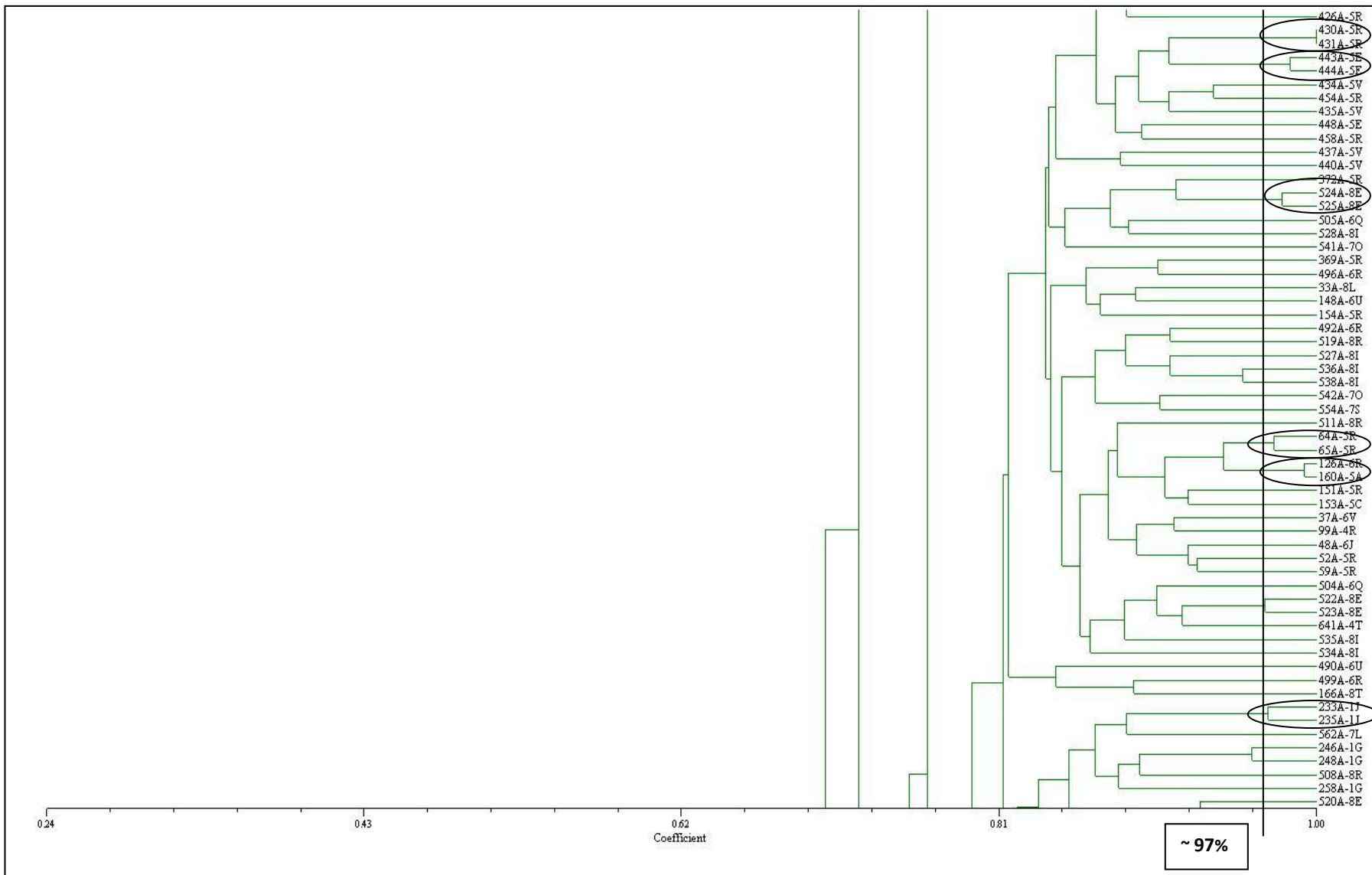
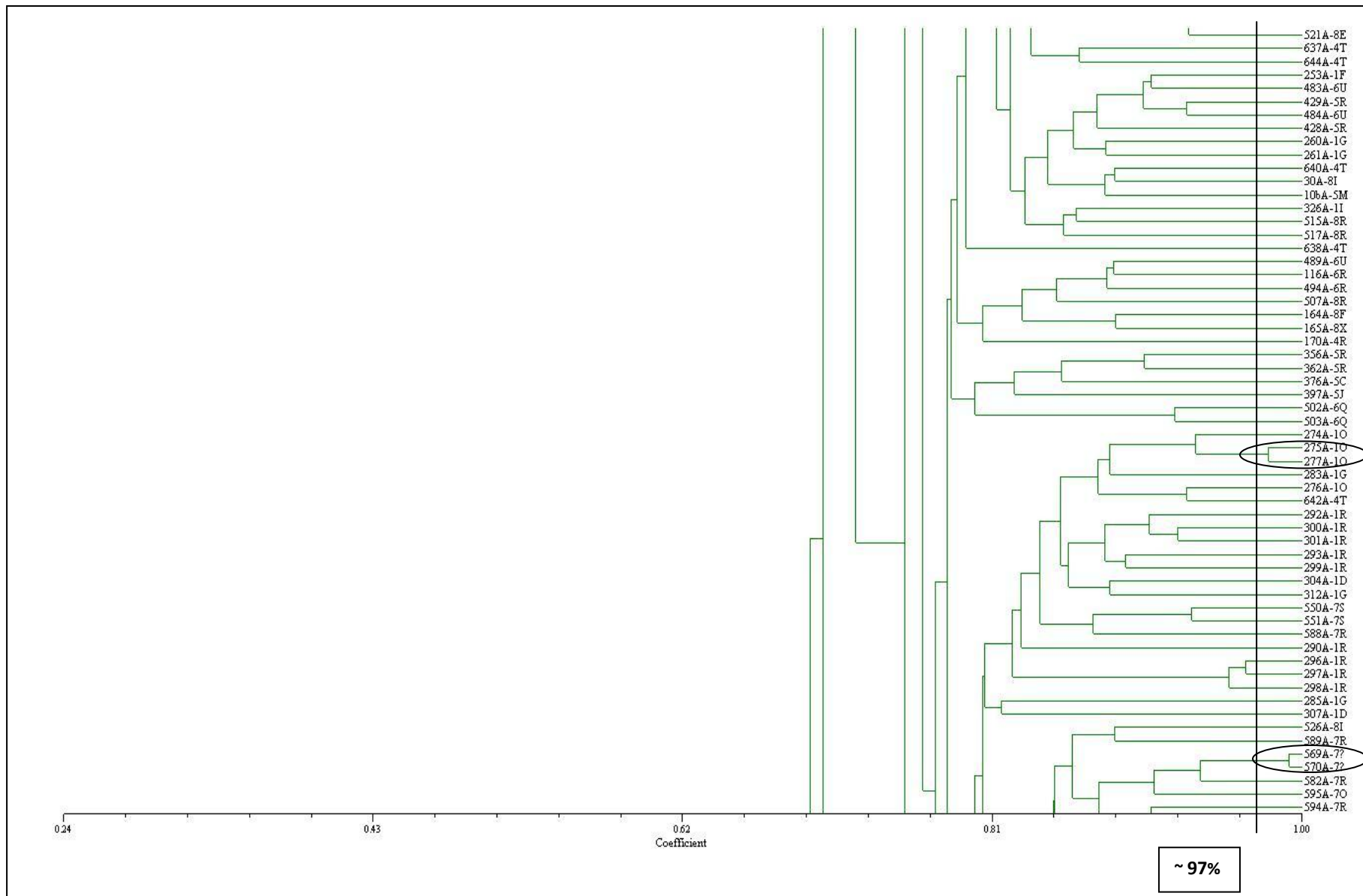


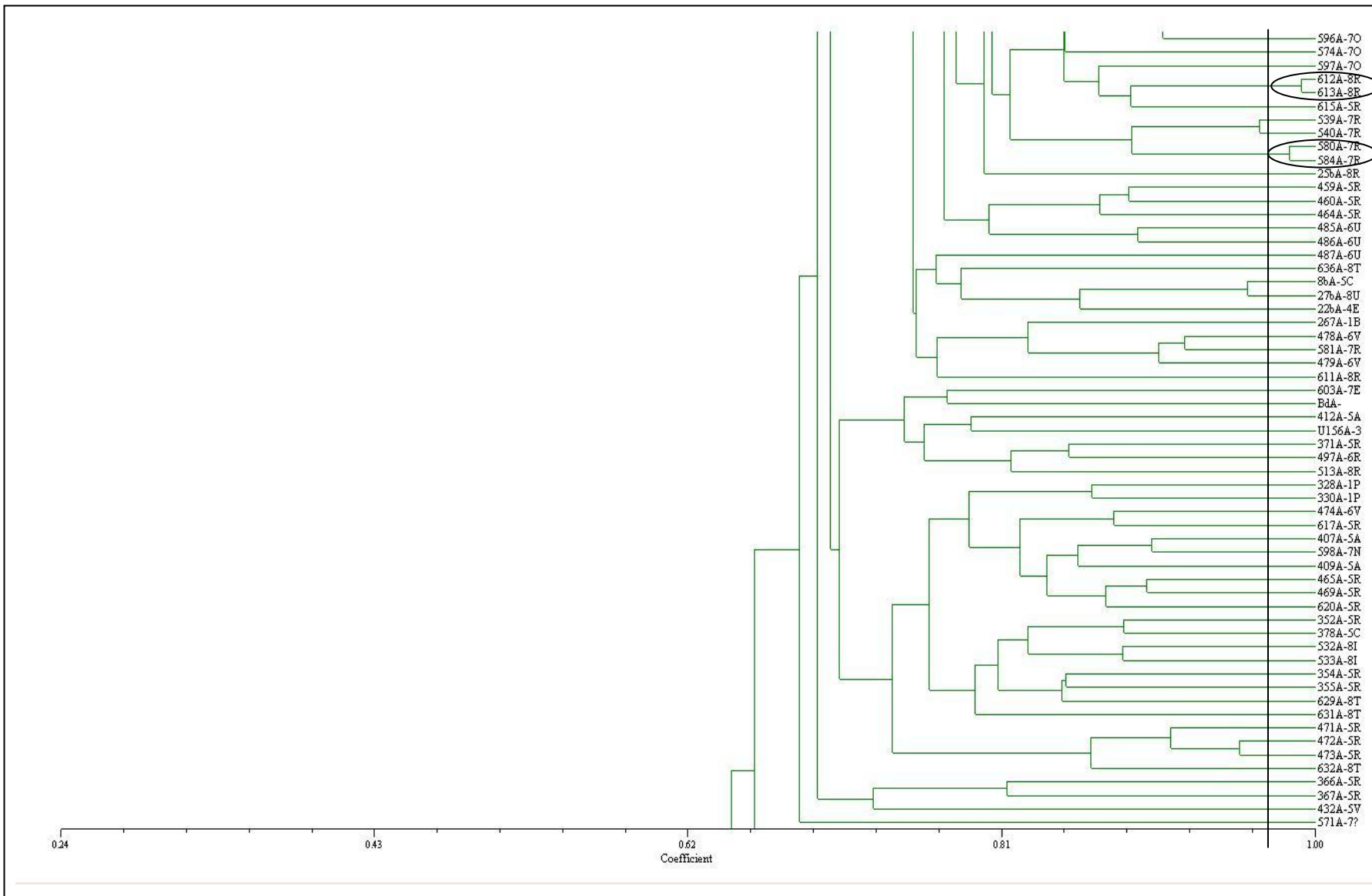
Figura 33. Dendrograma generado mediante el método de agrupamiento UPGMA utilizando una matriz (con clones) de coeficiente de similitud tipo DICE entre aislados de *B. cinerea*. Los aislados fueron obtenidos en las DO: 1-Arribes de Duero, 2-Bierzo, 3-Cádiz, 4-Cigales, 5-Ribera del Duero, 6-Rueda, 7-Sierra de Salamanca y 8-Toro, a partir de las variedades de vid: A-Albillo, B-Bruñal, C-Cabernet Sauvignon, D-Gajo Arroba, E-Garnacha, F-Jerez Palomino, G-Juan García, H-Maldón, I-Malvasía, J-Malbec, L-Moscatel, M-Merlot, N-Pipajo, O-Rufete, P-San Jeromo, Q-Sauvignon Blanc, R-Tempranillo, S-Tempranillo Blanco, T-Tinta de Toro, U-Verdejo, V-Viura y X-Teta de Cabra. Se incluyen las cepas de referencia EB05.10, T4, Bd90, UCA001, UCA156 y UCA206. En los elipses de color están identificados los aislados que son considerados clones. (En la parte superior de esta página se presenta el dendrograma completo sin códigos y en las páginas siguientes se muestra el dendrograma en detalle).

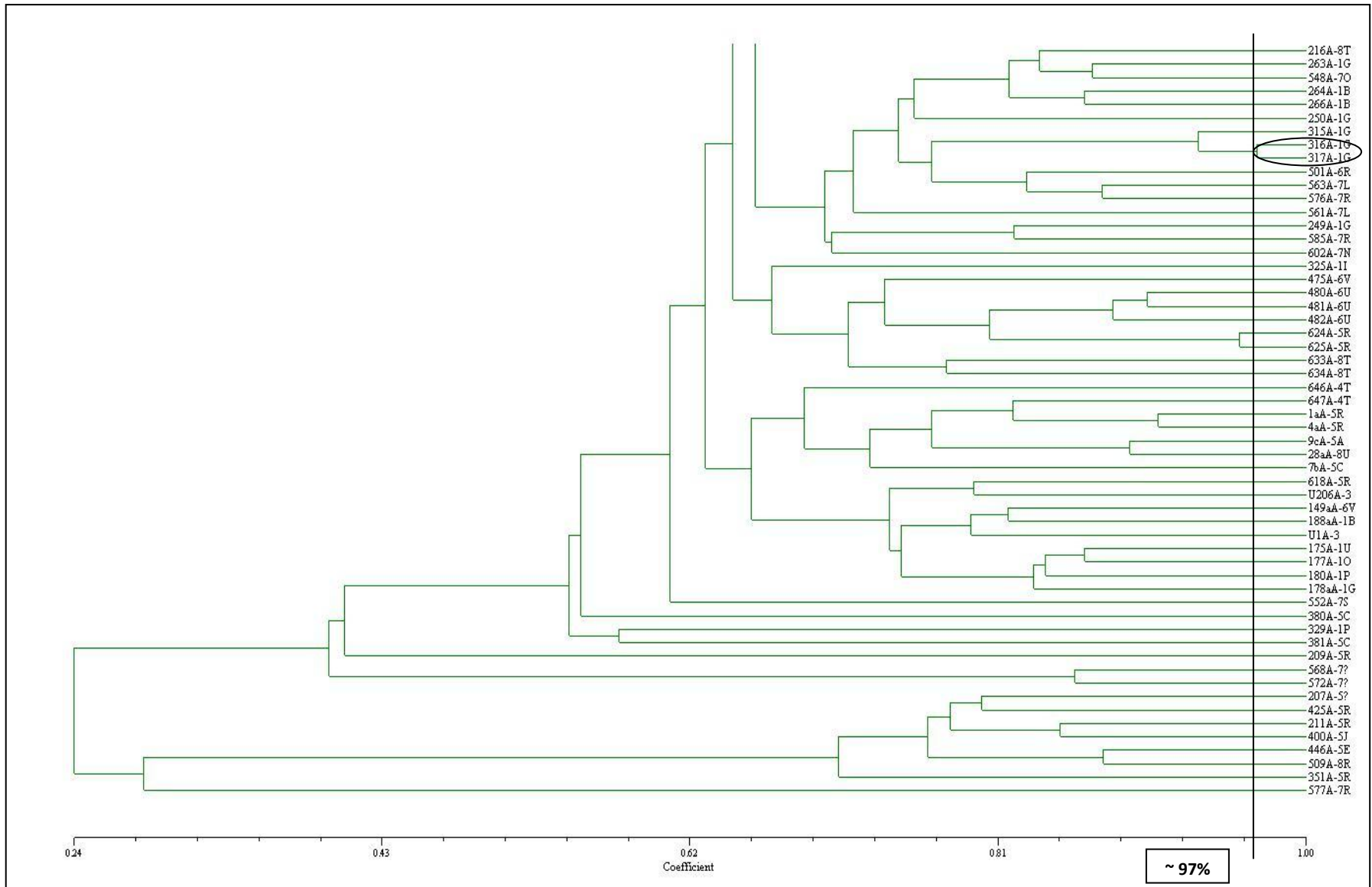


Resultados









El método de agrupamiento que se utiliza en cada caso al estudiar las similitudes genéticas entre individuos (p.e., UPGMA en nuestro análisis) puede generar distorsiones en el dendrograma en relación con los datos de similitud originales. Para comprobar la bondad de los resultados obtenidos se construyó la matriz cofenética y se calculó el coeficiente de correlación cofenética (r). La matriz de valores cofenéticos fue calculada con la matriz de distancia de Mantel (Mantel, 1967) y la significancia del coeficiente cofenético fue determinado a partir de 5,000 permutaciones. El valor obtenido fue de $r = 0,93$. Es este un valor alto (siendo el valor de $r > 0,9$, puede considerarse un valor muy bueno), lo que nos permite afirmar que el dendrograma generado constituye una buena representación de las relaciones de similitud entre los aislados analizados.

Con los datos originales se llevó a cabo un análisis de componentes principales para visualizar fácilmente las posibles relaciones entre individuos. La Figura 37 muestra los resultados obtenidos. De la observación de la misma se deduce la existencia de un grupo de individuos mayoritario, que incluye aproximadamente el 97% de los aislados estudiados, que no muestra una estructura interna definida (población englobada en una elipse de color verde), y un grupo muy minoritario, integrado por 10 individuos (población englobada en una elipse de color naranja), claramente diferenciado y separado del gran grupo.

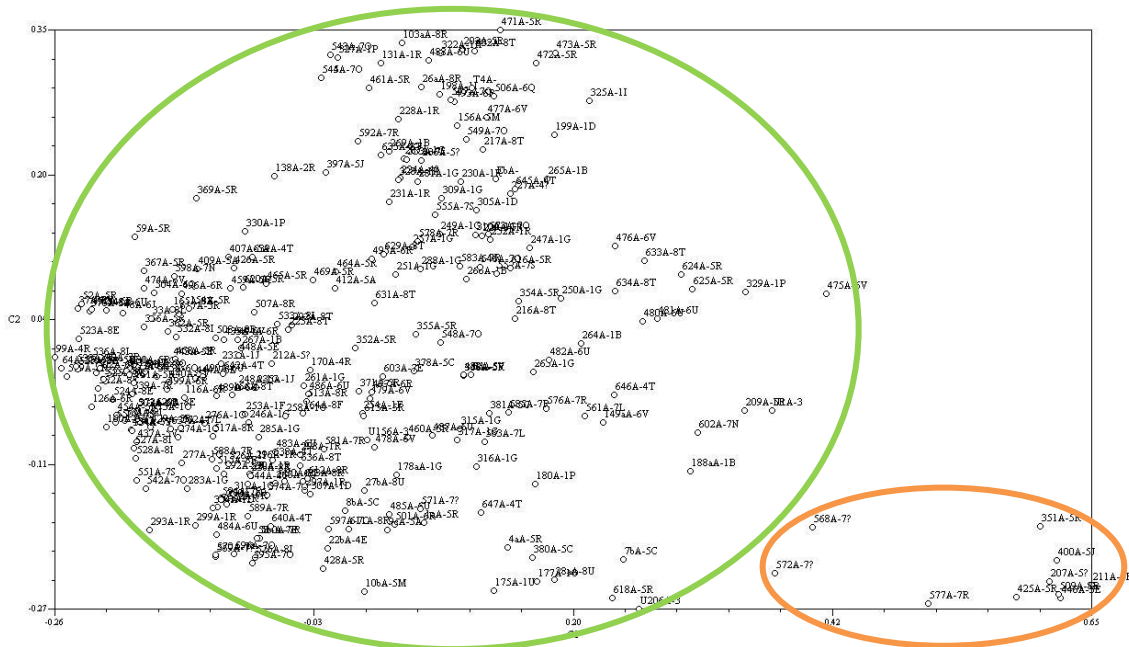


Figura 34. Análisis de Coordenadas Principales realizado con los datos de la población original (en el programa NTSyS). En verde fue marcado el grupo mayoritario que se agrupa en este análisis y en color naranja fue marcado el grupo que se separa de la mayoría de los aislados (Ver el texto para más detalles).

3.2.2.2 - PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES: D.O.

Siguiendo las indicaciones de Bentley y colaboradores, los individuos que presentan una similitud mayor que 97% deben ser considerados clones y por esta razón deben ser tratados de una manera especial en análisis posteriores (Bentley *et al.*, 2008). Según el análisis de similitud genética llevado a cabo utilizando el coeficiente de similitud de Dice en la sección 3.2.2.1., entre los 292 aislados analizados se identificaron 13 parejas de aislados que pueden considerarse clones, y un grupo de tres aislados, los identificados con los códigos 543, 544 y 545, que tienen unos CS mayores de 0,97, por lo que pueden ser considerados como tres individuos portadores del mismo haplotipo (los 14 grupos aparecen indicados mediante elipses en la Figura 33). Siguiendo la publicación indicada, a partir de la matriz inicial, "no corregida", que incluía los 292 aislados seleccionados, se generó una matriz derivada, denominada "corregida de clones", en la que se incluyó únicamente un representante de cada pareja de clones y un representante del grupo de tres individuos que representan el mismo haplotipo (en cada caso se seleccionó el miembro de cada grupo que ocupa la posición superior en el dendograma de la Figura 33 resultando así una tabla integrada por 277 aislados ($292 - [(13 \times 1) + (1 \times 2)]$). En el caso del haplotipo representado por los aislados 126 - obtenido en la D.O. Rueda - y 160 - obtenido en la D.O. Ribera del Duero - se mantuvo el aislado 126, ya que la población de aislados de Rueda considerada en este trabajo es menos numerosa.

Para llevar a cabo los estudios de cuantificación de diversidad genética y de determinación de estructuración en nuestras poblaciones objeto de estudio, decidimos trabajar en paralelo con las dos matrices de datos descritas una vez eliminadas en ambos casos las cepas externas utilizadas como cepas control en los análisis fisiológicos y los análisis de relaciones genéticas entre individuos (U001, U156, U206, Bd90, T4 y Eb05.10). También fue eliminada del análisis la cepa 138, la única cepa procedente de la D.O. Bierzo, dado que con una única cepa no es posible llevar a cabo un análisis poblacional. Así, la primera matriz, denominada "matriz original" o "matriz con clones", incluye todos los aislados autóctonos analizados, 285. En esta matriz se analizan un total de 150 marcadores moleculares que presentan frecuencias entre 0,05 y 0,95. La segunda tabla, denominada "matriz corregida de clones", incluye 270 aislados (285 aislados – 15 clones) y en la misma se analizan un total de 150 marcadores que muestran frecuencias entre 0,05 y 0,95 en ese conjunto de aislados.

Inicialmente, los índices de diversidad genética fueron estimados utilizando como criterio de subdivisión de la población global la pertenencia de cada aislado a una D.O. en Castilla y León. La matriz original incluía 150 marcadores moleculares, todos ellos polimórficos en la población considerada globalmente (PLP = 100%, puesto que sólo se consideraron en este análisis los *loci* para los cuales se detectaban frecuencias alélicas $0,05 < f < 0,95$). Dentro de las D.O. el porcentaje de *loci* polimórficos varió de 68,67% (Cigales) a 98,67% (Ribera del Duero y Toro) en la matriz con clones (Tabla 16).

Entre los 285 individuos analizados se identificaron 270 haplotipos diferentes, uno presentado por tres individuos y 13 presentados cada uno de ellos por dos individuos. Una vez eliminados los aislados considerados clones y trabajando, por lo tanto, con la "matriz corregida de clones", pudo comprobarse que todos los *loci* eran polimórficos en la población global (PLP = 100%). La consideración únicamente de los haplotipos no determinó cambios en los porcentajes de *loci* polimórficos en las subpoblaciones (Tabla 16).

Tabla 16. Índices de diversidad genética obtenidos analizando la población de aislados subdividida en función del factor D.O. donde se realizó la recogida de aislados. Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).

Población	n	<i>h</i>	PLP	N	G	G/N	FC
Arribes	67	0,2370	95,33%		61,49	0,961	4,69 %
Arribes (corregido)	64	0,2373	95,33%	64			
Cigales	15	0,2054	68,67%		15,0	1,0	0 %
Cigales (corregido)	15	0,2054	68,67%	15			
Ribera del Duero	74	0,2839	98,67%		68,45	0,977	2,85 %
Ribera (corregido)	70	0,2899	98,67%	70			
Rueda	36	0,2320	87,33%		36,0	1,0	0 %
Rueda (corregido)	36	0,2320	87,33%	36			
Sierra de Salamanca	46	0,2596	95,33%		36,48	0,889	9,75 %
Sierra (corregido)	41	0,2651	95,33%	41			
Toro	47	0,2393	98,67%		41,68	0,947	6,81 %
Toro (corregido)	44	0,2435	98,67%	44			
Total	285	0,2667	100,00%		256,23	0,949	5,18 %
Total (corregido)	270	0,2694	100,00%	270			

n = número de aislados analizados

h = diversidad genética de Nei

PLP = porcentaje de *loci* polimórficos

N = número de haplotipos

G = Diversidad genotípica

G/N = Diversidad genotípica normalizada

FC = Fracción Clonal

Un índice muy informativo sobre el grado de variabilidad genética existente en una población es la heterocigosidad promedio esperada de todos los *loci* o "diversidad genética de Nei" (*h*). Asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, el promedio de la diversidad genética de Nei (*h*) en la población en su conjunto fue estimado como 0,2667 a partir de la "matriz original" y 0,2694 en la "matriz corregida sin clones". Su valor dentro de las poblaciones varió entre

0,2054 (Cigales) y 0,2839 (Ribera del Duero) en la "matriz original". En la "matriz corregida" sin clones los valores variaron entre 0,2054 (Cigales) y 0,2899 (Ribera del Duero) (Tabla 16).

La diversidad genotípica en la población en su conjunto es muy elevada. En el total de 285 individuos se identificaron 270 haplotipos diferentes (ver Tabla 16). La diversidad genotípica (G) en la población global fue estimada con un valor de 256,23 y la diversidad genotípica normalizada (G/N) con un valor de 0,949. Ambos valores son valores ciertamente elevados, indicativos de una diversidad genotípica muy alta. Debemos recordar que la diversidad genotípica es máxima cuando el número de genotipos es igual al número de aislados, en cuyo caso la diversidad genética normalizada alcanza el valor de 1. De los 270 haplotipos identificados 256 resultaron ser únicos (representados por un único aislado), lo que determina un valor de la fracción clonal (FC) de 5,18%. En las poblaciones consideradas, las correspondientes a las distintas D.O. la diversidad genotípica fue también siempre elevada. En los casos de las D.O. de Cigales y Rueda la diversidad genotípica normalizada fue máxima, ya que en estas dos poblaciones no se detectaron clones. Se trata de las dos poblaciones menos numerosas y, lógicamente, la probabilidad de detectar clones es menor. En las poblaciones de Arribes del Duero, Ribera del Duero, Sierra de Salamanca y Toro, más numerosas, las diversidades genotípicas fueron también elevadas, con valores de diversidad genotípica normalizada que variaron entre 0,889, en el caso de la población de Sierra de Salamanca, y 0,977, la correspondiente a la población de Ribera del Duero. A la primera, Sierra de Salamanca, correspondió el mayor valor de Fracción Clonal detectado, 9,75%.

3.2.2.3 - ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

Una vez evaluadas las relaciones de similitud genética entre individuos y determinados los parámetros básicos de diversidad genética en las subpoblaciones que se pueden considerar en función del criterio D.O. se trató de determinar si existe o no algún tipo de estructura en la población en su conjunto. Para ello, tanto en un caso como en otro (es decir, considerando la población inicial con clones por una parte, y la población corregida sin clones, por otra) se calculó la heterocigosidad esperada promedio entre las subpoblaciones consideradas, H_s , como la media de las heterocigosidades esperadas de cada subpoblación. Los valores obtenidos resultaron ser de 0,2429 y 0,2455, respectivamente (ver Tabla 17). En ambos casos también se consideró la población global, suma de todas las subpoblaciones, como una única población y se determinó el valor de la Heterocigosidad esperada en la misma, H_t . Este valor resultó ser 0,2588 en la población original con clones y 0,2614 en la población corregida (Tabla 17).

Tabla 17. Cálculo del coeficiente de Diferenciación (G_{st}) y del número de migrantes (N_m) en la población original con clones y en la población corregida sin clones. (H_s : heterocigosidad promedio esperada; H_t : diversidad genética promedio sobre todos los *loci* en la población global).

Población	H_s	H_t	G_{st}	N_m
Con clones	0,2429	0,2588	0,06	7,62
Sin clones	0,2455	0,2614	0,06	7,72

Derivado del análisis de la matriz con clones se obtuvo un valor del coeficiente de diferenciación entre poblaciones (G_{st}) igual a 0,06. Con la matriz sin clones el valor del G_{st} obtenido fue el mismo. Es éste un valor situado en el límite de lo que se considera una diferenciación nula o baja (G_{st} entre 0 y 0,05) y una diferenciación moderada (G_{st} entre 0,05 y 0,15). Teniendo en cuenta estos valores, es posible concluir que la variabilidad genética en la población de *B. cinerea* de los viñedos de las distintas D.O de Castilla y León muestra un nivel de estructuración bajo, pero no nulo, y que existe una "moderada" diferenciación genética entre las poblaciones establecidas en función de este criterio geográfico. Es decir, las distintas subpoblaciones no son todas absolutamente idénticas entre sí y presentan cierto nivel de divergencia.

El número estimado de migrantes por generación (N_m) fue igual a 7,62 cuando se consideró la matriz original y 7,72 cuando se consideró la matriz corregida sin clones. Ambos valores (muy similares) son elevados, lo que indica que es posible detectar un movimiento muy significativo de individuos entre las poblaciones lo que, indudablemente, contribuye a limitar la diferenciación y la divergencia entre las subpoblaciones.

Se analizaron entonces las relaciones de similitud genética entre las propias subpoblaciones en la matriz sin clones. Conocidos los valores de las heterocigosidades de las distintas poblaciones fue posible calcular la identidad normalizada entre cada dos subpoblaciones en todas las combinaciones posibles y a partir de los valores de identidad normalizada se calcularon las "Distancias Genéticas de Nei" entre cada dos subpoblaciones. La Tabla 18 presenta los valores de "Distancia Genética de Nei" obtenidos para cada combinación de dos subpoblaciones.

Tabla 18. Valores de "Distancia Genética de Nei" entre subpoblaciones en las combinaciones indicadas, generados a partir de la matriz sin clones.

	Arribes	Cigales	Ribera del Duero	Rueda	Sierra de Salamanca	Toro
Arribes	0					
Cigales	0,0252	0				
Ribera del Duero	0,0359	0,0288	0			
Rueda	0,0258	0,0227	0,0193	0		
Sierra de Salamanca	0,0198	0,0307	0,0374	0,0295	0	
Toro	0,0280	0,0195	0,0133	0,0123	0,0287	0

La Figura 35 muestra un dendograma que presenta un agrupamiento tipo UPGMA basado en los valores de "Distancia Genética de Nei" entre las subpoblaciones (ver Tabla 18) y llevado a cabo con el programa Popgene. El análisis de los valores de Distancia Genética de Nei entre subpoblaciones demuestra que el grado de similitud que muestran todas ellas entre sí es muy alto (valores de Distancias Genéticas muy pequeños en todas las combinaciones), indicativo de un grado de uniformidad muy importante. Teniendo en cuenta que existe un muy elevado nivel de uniformidad, el estudio del dendograma permite visualizar, no obstante, dos grupos de poblaciones en función de su proximidad genética. Por una parte se agrupan las subpoblaciones de Arribes del Duero y de Sierra de Salamanca y, por otra parte, las otras cuatro subpoblaciones, Cigales, Ribera del Duero, Rueda y Toro. En esta rama, las subpoblaciones de Rueda y Toro presentan el mayor grado de similitud, estando ambas relacionadas muy próximamente con la subpoblación de Ribera del Duero y en menor medida con la subpoblación de Cigales. En una primera aproximación basada en el estudio de distribución geográfica de las D.O. estudiadas en este trabajo, esta visualización de las relaciones genéticas en las subpoblaciones en forma de dendograma permite deducir la existencia de una cierta relación entre distancia genética y distancia geográfica, ya que las poblaciones de Arribes del Duero y Sierra de Salamanca corresponden a dos áreas geográficas más próximas entre sí (ambas localizadas en la provincia de Salamanca en la parte más occidental de la Comunidad Autónoma de Castilla y León) que con las otras cuatro subpoblaciones consideradas que, a su vez, están localizadas más próximas entre sí en la zona centro y más oriental de la Comunidad Autónoma. Precisamente las poblaciones de las D.O. de Rueda y Toro fueron las poblaciones que presentan una menor distancia geográfica y son también las que presentan entre sí una menor distancia genética.

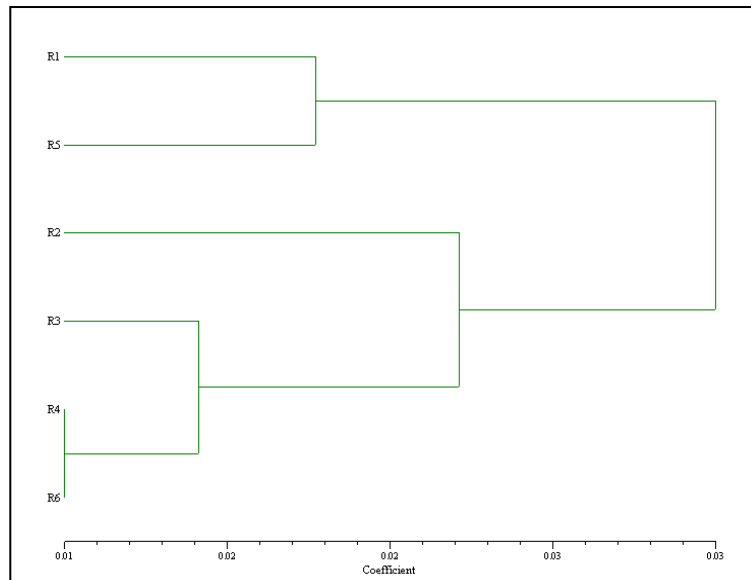


Figura 35. Dendrograma UPGMA (realizado con el programa NTSyS) construido con los valores de "Distancia Genética de Nei" (Coeficiente) entre subpoblaciones presentados en la Tabla 18 y generados con el programa PopGene. Los códigos identificativos de las poblaciones de *B. cinerea* establecidas en función de las D.O. son: R1-Arribes, R2-Cigales, R3-Ribera del Duero, R4-Rueda, R5-Sierra de Salamanca y R6-Toro.

A continuación, para visualizar de manera sencilla las relaciones entre las poblaciones consideradas atendiendo al criterio de clasificación D.O. se llevó a cabo un Análisis de Coordenadas Principales con la matriz original y con la matriz corregida sin clones utilizando el programa FAMD (Figura 36). Los resultados obtenidos fueron esencialmente los mismos trabajando con una matriz y con otra. La Figura 36 muestra una representación de las relaciones detectadas. Las poblaciones de las Denominaciones de Origen de Cigales, Toro y Rueda son las más cercanas geográficamente y en la representación generada estas tres poblaciones son las que aparecen más próximas entre sí, observación indicativa de un mayor grado de similitud genética entre las mismas. Por su parte, las poblaciones de Arribes de Duero y de Sierra de Salamanca, aunque ciertamente distantes entre sí, están más relacionadas la una con la otra que con las poblaciones de Cigales, Toro y Rueda. Finalmente, la población de Ribera del Duero se muestra como una entidad independiente, distante en una medida similar tanto de las poblaciones Arribes de Duero - Sierra de Salamanca, como de las poblaciones Cigales - Toro - Rueda.

Es interesante destacar que esta representación de las relaciones de similitud entre las poblaciones establecidas en función del criterio D.O. apunta en la misma dirección que el análisis basado en el cálculo de distancia genética de Nei entre poblaciones y presentado en el dendrograma de la Figura 35. Ambos tipos de análisis sugieren que a nivel poblacional muestran una mayor similitud genética las poblaciones geográficamente más próximas y una menor similitud genética las poblaciones geográficamente más distantes.

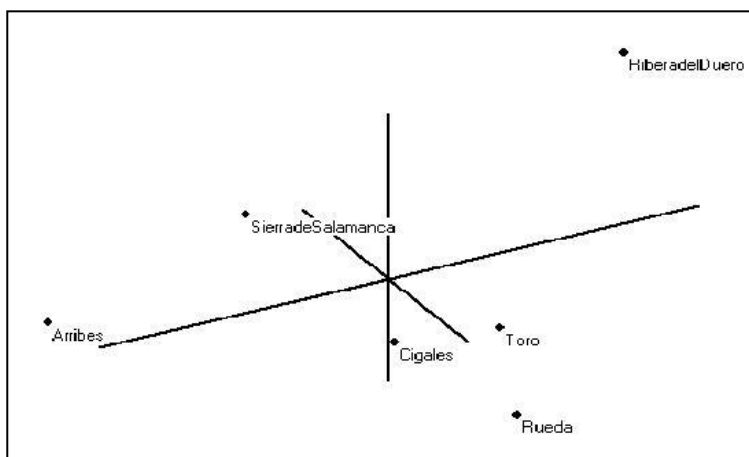


Figura 36. Análisis de Coordenadas Principales para las 6 poblaciones (D.O.) con la matriz con clones.

Habiendo detectado evidencias indicativas de que existe una cierta relación entre distancia genética entre subpoblaciones de aislados y distancia geográfica de las áreas de recogida decidimos llevar a cabo un estudio de correlación más preciso entre ambas variables. En primer lugar se estimaron las distancias lineales entre las zonas productoras consideradas. Dado que se trata de áreas geográficas más o menos extensas, y para facilitar nuestro análisis, se eligió para cada Denominación de Origen una localidad representativa localizada aproximadamente en el centro geográfico de la misma. En la Tabla 19 se recogen las distancias lineales entre las localidades seleccionadas como representativas (las localidades seleccionadas se indican para cada zona productora en la propia Tabla 19).

Tabla 19. Distancia lineal (Km) entre las localidades representativas seleccionadas como centro geográfico de cada Denominación de Origen o zona de Vinos de la Tierra.

	Arribes	Cigales	Ribera del Duero	Rueda	Sierra de Francia	Toro
Arribes (Pereña)	0					
Cigales (Cigales)	162,79	0				
Ribera del Duero (Roa)	222,7	64,53	0			
Rueda (Rueda)	132,59	43,74	91,38	0		
Sierra de Francia (San Esteban de la Sierra)	96,77	171,83	212,32	128,58	0	
Toro (Morales de Toro)	106,94	56,19	116,42	32,55	125,25	0

Conocidas la Distancia Genética de Nei entre cada dos subpoblaciones y la Distancia Geográfica entre las localidades consideradas como centro geográfico de cada zona productora se llevó a cabo un análisis de correlación. La Figura 37 muestra que entre ambas variables existe una correlación positiva notable, siendo el valor del Coeficiente de Correlación $r = 0,69$. Esto supone que en buena medida la diferenciación genética de las poblaciones es función de la distancia geográfica existente entre las zonas en las que se llevan a cabo las recogidas de muestras.

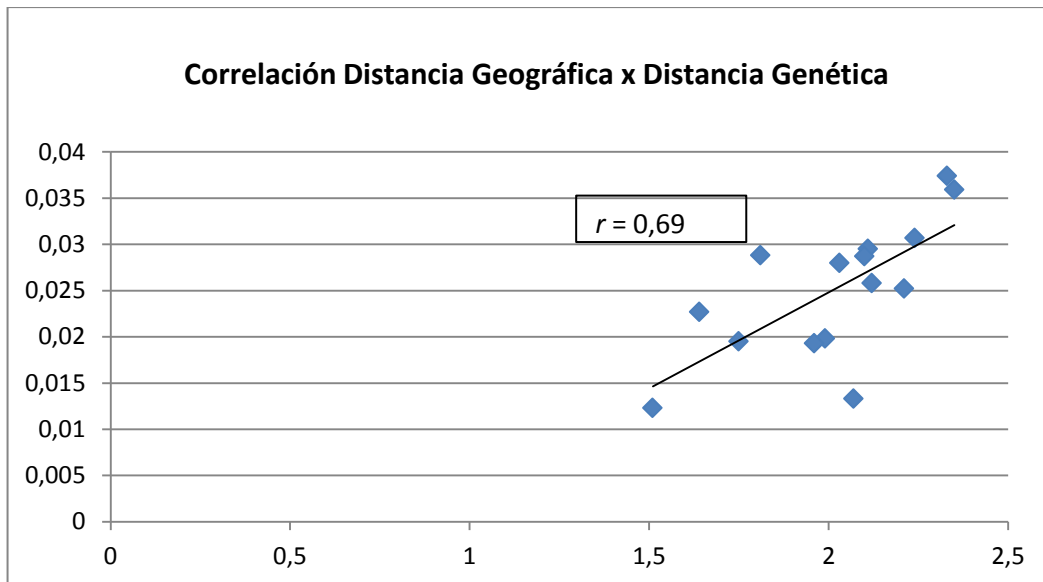


Figura 37. Correlación entre la Distancia Geográfica (eje X, expresada como el logaritmo neperiano de la distancia en Km) y la Distancia Genética de Nei (eje Y) entre poblaciones de las zonas productoras de Castilla y León seleccionadas.

Para agrupar los aislados utilizando un método de agrupamiento Bayesiano no espacial de inferencia estadística se llevó a cabo un análisis con el programa Structure v.2.3. Este programa permite deducir la estructura poblacional, identificar distintas poblaciones, asignar individuos a poblaciones e identificar migrantes e individuos mezclados (Pritchard *et al.*, 2000a).

En este análisis se utilizaron dos modelos de ascendencia: el modelo de mezcla, en el cual se considera que los individuos pueden tener la ascendencia mezclada (es el caso aplicado a poblaciones reales complejas) y el modelo de no mezcla (que es el modelo utilizado en poblaciones completamente discretas y que resulta muy eficiente para detectar una estructura poblacional cuando ésta es débil o tenue).

Inicialmente asumimos un modelo en el que existen K poblaciones (el número de poblaciones puede ser desconocido, pero en nuestro caso, asumimos que las 6 D.O. son nuestras 6 poblaciones). En un primer análisis utilizando el modelo de mezcla, no identificamos

el origen de los aislados, procurando de esta manera, observar si el programa encontraba o estimaba otro número de poblaciones. Luego utilizamos el mismo modelo e identificamos la procedencia de los aislados. Los valores ΔK obtenidos indican que la variación del conjunto de los datos se explica mejor cuando son consideradas 7 poblaciones, utilizando el modelo de mezcla. El resultado $K=7$ indica que la probabilidad posterior de los datos, $(\text{LnPr}(X|K))$, generó valores más bajos cuando K fue igual 7. Se realizó el análisis por duplicado y se obtuvo el mismo valor de K . Cuando agregamos a este modelo la información de la localidad donde se recorrieron los aislados, se obtuvo un valor igual al modelo anterior.

En el análisis con el modelo de no mezcla, también se obtuvo un número de agrupamientos igual a 7, confirmando de esa manera, el probable número de poblaciones del hongo *B. cinerea* presentes en los viñedos de Castilla y León.

Para analizar más en profundidad el efecto del factor D.O. -zona productora- (factor de agrupamiento) sobre la estructura genética de la población de aislados de *B. cinerea* recogidos en los viñedos de Castilla y León y analizados en este trabajo, se llevó a cabo un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin (Tabla 20). Las subpoblaciones utilizadas en este análisis son las mismas poblaciones utilizadas en los análisis anteriores. Los resultados generados trabajando con la matriz con clones indicaron que la mayor parte de la variación ocurre dentro de las poblaciones (94,80%) y que apenas un 5,20% de la variación tiene su origen en las diferencias entre las poblaciones, en este caso, entre las zonas productoras analizadas. Cuando se consideró la matriz sin clones el análisis de AMOVA indicó que un 4,95% del total de la variabilidad genética es variación observada entre poblaciones y que un 95,04% es variación observada dentro de las poblaciones.

El valor del porcentaje de la variación genética entre poblaciones puede ofrecer información sobre el valor del índice F_{st} . De esta forma, trabajando en el análisis llevado a cabo con la matriz con clones, un valor del porcentaje de variación entre poblaciones de 5,2%, supone un valor de F_{st} (0,052) muy próximo a 0,05, lo que representa un valor indicativo de poca diferenciación genética). Hay que llamar la atención sobre el hecho de que el análisis AMOVA es un tipo de análisis más indicado y apropiado para el estudio de la variación haplotípica (Holsinger and Weir, 2009), como es nuestro caso, ya que los perfiles de AFLPs constituyen datos haplotícos. Por lo tanto, a la hora de tratar de describir la posible estructuración de una población manejando perfiles de marcadores moleculares tipo AFLP una herramienta de análisis como el AMOVA puede considerarse como la herramienta más apropiada.

Tabla 20. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de *B. cinerea* teniendo en cuenta el factor de agrupamiento D.O. (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).

	Fuente de variación	gl	Componente de variación	P-valor	% de variación
Con clones	Entre poblaciones	5	1,05410	0,00	5,20%
	Dentro poblaciones	279	19,22171		94,80%
Total		284	20,27581		
Sin clones	Entre poblaciones	5	1,01505	0,00	4,95%
	Dentro poblaciones	264	19,45866		95,04%
Total		269	20,47371		

3.2.2.4 - EFECTO DEL CRITERIO "VARIEDAD DE VID" Y "AÑO DE RECOGIDA"

Después de analizar la estructura genética en las poblaciones colectadas en función del criterio zona productora decidimos evaluar si existe o no algún tipo de estructura en la población en función de otros dos tipos de criterio de clasificación de los aislados recogidos: (1) la variedad de vid de origen de cada aislado y (2) el año de recolección. En otras palabras, nos pareció interesante evaluar si el factor "variedad de uva de origen" o el factor "año de recolección" imponían alguna restricción en la forma en que la variabilidad genética se estructura en las poblaciones naturales de *B. cinerea* de nuestros viñedos.

Con este objeto la población de aislados analizada y subdividida en función del criterio D.O. fue ahora subdividida en subpoblaciones en función de estos dos nuevos criterios. Las Tablas 21 y 22 presentan los datos de distribución de aislados en subpoblaciones en ambos casos. En relación con el criterio "variedad de origen de vid" se consideraron 8 subpoblaciones, aquellas correspondientes a las variedades de vid para las cuales disponíamos de un número de aislados lo suficientemente elevado como para llevar a cabo un análisis poblacional. Concretamente las variedades consideradas fueron: Garnacha, Juan García, Malvasía, Rufete, Tempranillo, Tinta de Toro, Verdejo y Viura. En total la población analizada incluyó 220 cepas de campo (Ver Tabla 21). En relación con el criterio "año de recolección" se consideraron todos los aislados de campo analizados en función del criterio D.O., 285 en total, distribuidos en dos poblaciones integradas por 42 individuos la primera (año 2002) y por 243 individuos la segunda (año 2007) (ver Tabla 22).

Tabla 21. Relación del número de aislados agrupados por Variedad de Uva.

Variedades de Uva	Número de Aislados
Garnacha	12
Juan García	23
Malvasía	13
Rufete	19
Tempranillo	103
Tinta de Toro	22
Verdejo	15
Viura	13
Total	220

Tabla 22. Relación del número de aislados agrupados por año de aislamiento.

Año	Número de Aislados
2002	42
2007	243
Total	285

En primer lugar analizamos la población subdividida en función del criterio "variedad de vid de origen" trabajando tanto con la matriz original con clones como con la matriz corregida sin clones. La Tabla 23 presenta los valores de los índices de diversidad genética característicos de las poblaciones consideradas, así como los datos de la población global suma de las subpoblaciones consideradas como una única unidad.

Tabla 23. Índices de diversidad genética analizando la población de aislados subdividida en función del criterio "Variedad de vid de origen". Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).

Populación	n	<i>h</i>	PLP	N	G	G/N	FC
Garnacha	12	0,2067	77,33%		9,00	0,900	20,0 %
Garnacha (corregido)	10	0,2220	76,00%	10			
Juan García	23	0,2147	76,00%		21,16	0,962	4,54 %
J. García (corregido)	22	0,2117	76,00%	22			
Malvasía	13	0,2023	65,33%		13,00	1,000	0 %
Malvasía (corregido)	13	0,2023	65,33%	13			
Rufete	19	0,2108	73,33%		12,45	0,83	20,0 %
Rufete (corregido)	15	0,2123	73,33%	15			
Tempranillo	103	0,2695	100,00%		95,57	0,965	4,05 %
Tempranillo (corregido)	99	0,2722	100,00%	99			
Tinta de Toro	22	0,2370	84,67%		20,17	0,960	4,76 %
T. de Toro (corregido)	21	0,2407	84,67%	21			
Verdejo	15	0,2056	66,67%		15,00	1,0	0 %
Verdejo (corregido)	15	0,2056	66,67%	15			
Viura	13	0,2204	67,33%		13,00	1,0	0 %
Viura (corregido)	13	0,2204	67,33%	13			
Total	220	0,2571	100,00%		196,75	0,946	5,29 %
Total (corregido)	208	0,2591	100,00%	208			

n = número de aislados analizados

h = diversidad genética de Nei

PLP = porcentaje de *loci* polimórficos

N = número de haplotipos

G = Diversidad genotípica

G/N = Diversidad genotípica normalizada

FC = Fracción Clonal

En la Tabla 23 verificamos que el valor del índice de diversidad génica de Nei (*h*) en la población total fue igual a 0,2571 en la matriz original, variando este valor en las distintas poblaciones entre 0,2023 (Malvasía) y 0,2695 (Tempranillo). En el caso del análisis realizado trabajando con la matriz sin clones el valor de la diversidad genética de Nei en la población total fue igual a 0,2591. En las distintas poblaciones el valor varió entre 0,2023 (Malvasía) y 0,2722 (Tempranillo). El porcentaje de *loci* polimórficos fue del 100% en la población global. También fue del 100% en la población más numerosa, la población Tempranillo, siendo inferior en las demás poblaciones.

La diversidad genotípica en la población en su conjunto es muy elevada. En el total de 220 individuos se identificaron 208 haplotipos diferentes (ver Tabla 23). La diversidad genotípica (G) en la población global fue estimada con un valor de 196,75 y la diversidad genotípica normalizada (G/N) con un valor de 0,946. Ambos valores son valores ciertamente elevados, indicativos de una diversidad genotípica muy alta. De los 208 haplotipos identificados

197 resultaron ser únicos (representados por un único aislado), lo que determina un valor de la fracción clonal (FC) de 5,29%. En las poblaciones consideradas, las correspondientes a las distintas Variedades de Vid la diversidad genotípica fueron también siempre elevadas. En los casos de las Variedades de Vid Malvasía, Verdejo y Viura la diversidad genotípica normalizada fue máxima, ya que en estas dos poblaciones no se detectaron clones. En las poblaciones de Garnacha, Juan García, Rufete, Tempranillo y Tinta de Toro, las diversidades genotípicas fueron también elevadas, con valores de diversidad genotípica normalizada que variaron entre 0,83, en el caso de la población de Rufete, y 0,965, la correspondiente a la población de Tempranillo. Las poblaciones de Garnacha y Rufete, mostraron el mayor valor de Fracción Clonal detectado, 20%.

Conocidos los valores de diversidad genética en las distintas poblaciones fue posible calcular la identidad normalizada entre cada dos subpoblaciones y las correspondientes distancias genéticas de Nei.

Se construyó un dendograma con un agrupamiento tipo UPGMA basado en la matriz de distancia genética de Nei (utilizando el coeficiente de similitud Dice) en el programa NTSyS para las poblaciones de las variedades de uva sin clones. Con este análisis queríamos observar si hay alguna estructura genética en función de la variedad de uva donde el hongo fue encontrado. La Figura 38 muestra el dendograma obtenido atendiendo al criterio "Variedades de Vid de origen". También en este caso se observa que las poblaciones analizadas muestran una elevadísima similitud genética (las distancias genéticas de Nei en todos los casos son muy bajas, inferiores a 0,0578 – Distancia genética entre las poblaciones de Garnacha y Juan García). No obstante, es posible detectar relaciones de mayor o menor similitud entre poblaciones concretas. Así, las poblaciones se organizan en dos clados. Por una parte se agrupan las poblaciones derivadas de las variedades Rufete y Juan García y, por otra parte, se agrupan en una rama diferente todas las demás poblaciones. En esta segunda rama las poblaciones se organizan también en dos clados: en el primero se incluyen las poblaciones de Garnacha y Malvasía. En el segundo quedan incluidas todas las demás. Es interesante destacar que en esta última rama se incluyen las poblaciones de Tempranillo y de Tinta de Toro, que son prácticamente idénticas (valor de distancia genética de Nei = "0,0158"). Los aislados de una y otra población proceden de localizaciones geográficas diferentes (de las distintas D.O.) pero una población y otra resultan muy similares entre sí. Ambas variedades de vid, aunque tienen nombres diferentes, son genéticamente idénticas y, en realidad, ambas son variedad "Tempranillo" (Larousse do Vinho, 2004).

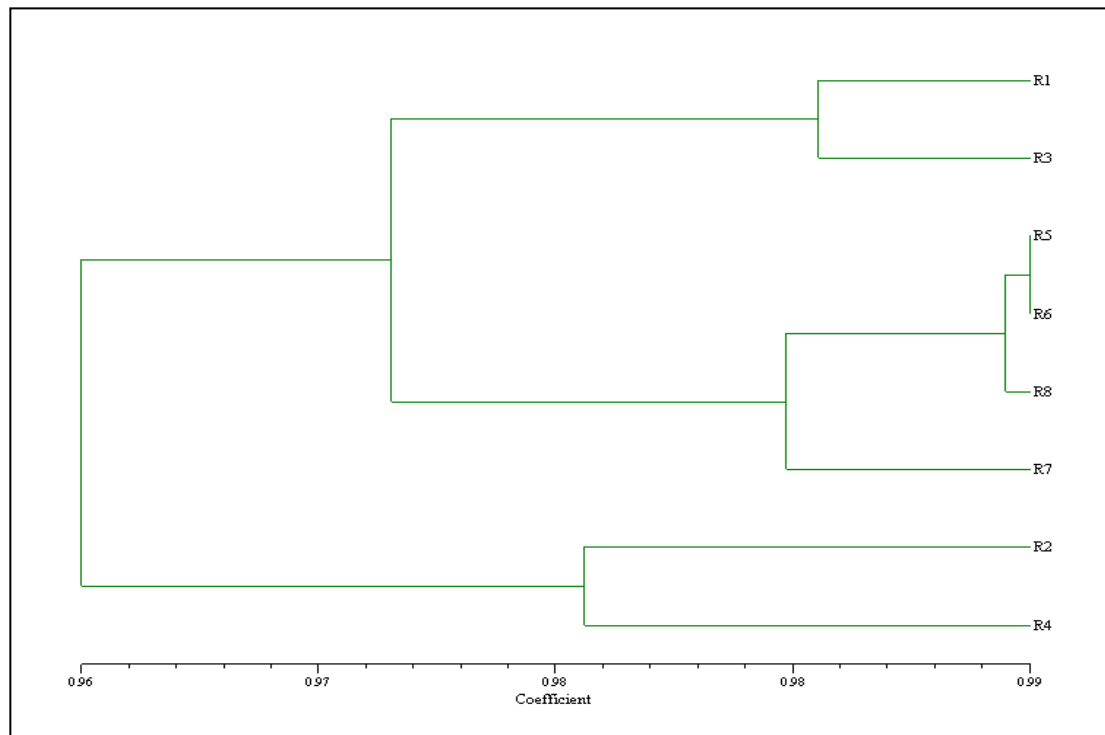


Figura 38. Dendrograma UPGMA de las poblaciones de *B. cinerea* establecidas según las variedades de vid a partir de las cuales los aislados fueron recogidos y construido sobre los valores de Distancia Genética de Nei entre subpoblaciones. (R1-Garnacha, R2-Juan García, R3-Malvasía, R4-Rufete, R5-Tempranillo, R6-Tinta de Toro, R7-Verdejo y R8-Viura).

Este análisis demuestra que las poblaciones establecidas en función del criterio "variedad de vid de origen" son muy similares entre sí, pero que existen diferencias en el grado de similitud. Para profundizar en la determinación del modo en el que la variabilidad genética se estructura en función de este criterio llevamos a cabo un análisis de la varianza molecular AMOVA sobre estas poblaciones. Este análisis utilizando la matriz con clones y llevado a cabo con el programa Arlequin demostró que el 95,64% de la variación ocurre dentro de las poblaciones y que 4,36% ocurre entre poblaciones. Estos valores fueron un poco más bajos cuando se utilizó la matriz sin clones (Tabla 24). En el análisis con clones, el valor del porcentaje de variación entre poblaciones fue igual a 4,36%, determinando un valor de F_{st} igual a 0,04 (un valor que indica poca diferenciación genética). En el análisis sin clones el valor de F_{st} obtenido fue aún más bajo ($F_{st}=0,03$). En ambos casos es posible concluir que existe poca diferencia genética entre aislados recogidos de variedades de uva diferentes.

Tabla 24. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de *B. cinerea* teniendo en cuenta el factor de agrupamiento "Variedad de vid de origen") (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).

	Fuente de variación	gl	Componente de variación	P-valor	% de variación
Con clones	Entre poblaciones	7	0,84353	0,00	4,36%
	Dentro poblaciones	213	18,52065		95,64%
Total		220	19,36418		
Sin clones	Entre poblaciones	7	0,72137	0,00	3,65%
	Dentro poblaciones	200	18,99351		96,34%
Total		207	19,71488		

Una vez considerado el factor "variedad de vid de origen" evaluamos el efecto del factor "año de recogida". En este caso sólo se establecen dos poblaciones, las correspondientes a los años 2002 y 2007. La Tabla 25 resume los índices de diversidad genética que caracterizan ambas poblaciones.

Tabla 25. Índices de diversidad genética analizando la población de aislados subdividida en función del año de recolecta. Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones).

Populación	n	h	PLP	N	G	G/N	FC
2007	243	0,2700	100,00%		217,89	0,947	5,22%
2007 (corregido)	230	0,2728	100,00%	230			
2002	42	0,2273	80,67%		38,34	0,958	5,00%
2002 (corregido)	40	0,2299	80,67%	40			
Total	285	0,2667	100,00%		256,23	0,949	5,19%
Total (corregido)	270	0,2694	100,00%	270			

n = número de aislados analizados
h = diversidad genética de Nei
PLP = porcentaje de *loci* polimórficos
N = número de haplótipos
G = Diversidad genotípica
G/N = Diversidad genotípica normalizada
FC = Fracción Clonal

Puesto que la población global considerada atendiendo al criterio temporal es la misma población total considerada atendiendo al factor geográfico, los índices de diversidad de la población general son los mismos que se presentaron en la Tabla 16, todos ellos indicativos de una diversidad genética en la población en su conjunto muy elevada. En las subpoblaciones

consideradas, las correspondientes a los distintos Años, las diversidades genóticas fueron también siempre elevadas (Tabla 25). En el caso del Año 2007, la diversidad genotípica normalizada fue 0,947 y en 2002 ese valor fue igual a 0,958. Las poblaciones de 2007 y 2002, presentaron un valor de Fracción Clonal similar, 5,22% y 5%, respectivamente.

En la Tabla 26 se presentan los resultados del análisis de la estructura genética de la población de aislados de *B. cinerea* subdividida en esta ocasión en función del año de recogida (2002 y 2007) y llevado a cabo utilizando el análisis de AMOVA del programa Arlequin. El análisis AMOVA en la matriz con clones indicó que el 96,94% de la variación ocurre dentro de las poblaciones y que el 3,06% de la variación ocurre entre las poblaciones. El análisis realizado en la matriz sin clones resultó en unos valores parecidos: 97,19% dentro de poblaciones y 2,80% entre poblaciones. El valor de F_{st} obtenido en el análisis con clones indicó una baja diferenciación genética ($F_{st}=0,03$) y aún más baja en el análisis sin clones ($F_{st}=0,02$). Estos valores, inferiores a los obtenidos considerando los dos criterios analizados anteriormente, indican que el grado de diferenciación entre poblaciones que impone el factor año de aislamiento es muy pequeño, menor que el que impone el criterio geográfico (zona productora de recogida) y el criterio variedad de vid de recogida. En términos de estructura genética, las dos poblaciones analizadas, las correspondientes a los años 2002 y 2007, son muy similares.

Tabla 26. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de *B. cinerea* teniendo en cuenta el factor de "Año de recogida". (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).

	Fuente de variación	gl	Componente de variación	P-valor	% de variación
Con clones	Entre poblaciones	1	0,62266	0,00	3,06%
	Dentro poblaciones	284	19,70070		96,94%
Total		285	20,32335		
Sin clones	Entre poblaciones	1	0,58116	0,00	2,80%
	Dentro poblaciones	268	20,13272		97,19%
Total		269	20,71388		

3.2.2.5 - ANÁLISIS DE LA DIFERENCIACIÓN DE LA POBLACIÓN "MINORITARIA"

El análisis del dendrograma obtenido entre los distintos aislados analizados inicialmente utilizando los valores del coeficiente de similitud de Dice ha mostrado que en nuestra población cabe distinguir una población mayoritaria, que no muestra una estructura evidente ni por D.O. ni por variedad de vid de origen, y una población muy minoritaria, integrada por 8-10 individuos que se agrupan en un clado diferente, que muestra una notable heterogeneidad y con valores de similitud genética con la mayoría de los aislados de la población mayoritaria ciertamente pequeños, lo que podría ser indicativo de un grado de diferenciación importante entre ambas poblaciones. Estas observaciones nos llevaron a considerar interesante determinar si entre ambas poblaciones, la mayoritaria y la minoritaria, es posible detectar algún grado de diferenciación utilizando las herramientas a nuestra disposición en el programa POPGENE. Considerando la población original global, sin excluir los clones y subdividiendo esta población en la población mayoritaria integrada por 275 individuos y la población minoritaria integrada por 10 individuos, se calculó un valor del coeficiente de diferenciación, G_{st} , de 0,37 (Tabla 27). En este análisis el valor del índice de migrantes N_m obtenido fue de 0,84. Cuando se consideró como población de partida la población resultante una vez eliminados los clones, se obtuvieron valores de G_{st} y de N_m muy similares a los anteriores. Son valores indicativos en un caso y otro (con clones y sin clones) de una diferenciación muy importante entre estas dos poblaciones identificadas, con un flujo de genes muy limitado entre ambas.

Tabla 27. Cálculo del coeficiente de Diferenciación (G_{st}) y del número de migrantes (N_m) en la población original con clones y en la población corregida sin clones considerando la población subdividida en la población mayoritaria y en la población minoritaria detectadas en nuestro análisis (H_s : heterocigosidad promedio esperada; H_t : diversidad genética promedio sobre todos los *loci* en la población global).

Población	H_s	H_t	G_{st}	N_m
Con clones	0,2270	0,3617	0,3724	0,8426
Sin clones	0,2280	0,3618	0,3698	0,8519

Llevamos a cabo a continuación un análisis AMOVA considerando esta subdivisión de la población global. Los valores obtenidos (Tabla 28) fueron similares cuando se consideró la población con clones y población sin clones. En ambos casos se observa que una fracción muy importante de la variación total (aproximadamente un 50%) tiene su origen en las diferencias que existen entre las poblaciones y que otro 50% de la variación es variación dentro de las poblaciones. Estos datos sugieren igualmente que ambas poblaciones son poblaciones muy diferentes que presentan características genéticas distintas.

Tabla 28. Análisis de la varianza molecular considerando la población de aislados de *B. cinerea* subdividida en la población mayoritaria y en la población minoritaria detectadas en nuestro análisis (Datos obtenidos con las matrices de datos binarios que incluyen los marcadores con frecuencias $0.05 \leq f \leq 0.95$).

	Fuente de variación	gl	Componente de variación	P-valor	% de variación
Con clones	Entre poblaciones	1	19,23049	0,00	50,61%
	Dentro poblaciones	283	18,76687		49,38%
Total		284	37,99736		
Sin clones	Entre poblaciones	1	19,08821	0,00	50,23%
	Dentro poblaciones	268	18,91332		49,76%
Total		269	38,00153		

3.3 - ANÁLISIS DEL MODO DE REPRODUCCIÓN DE *B. CINEREA* EN LOS VIÑEDOS DE CASTILLA-LEÓN

Una vez evaluadas la diversidad y la estructura genética en las poblaciones de *B. cinerea*, abordamos el análisis del último aspecto en relación con el cual nos interesaba caracterizar nuestra población de aislados proponiéndonos obtener información sobre el modo de reproducción de *B. cinerea* en los viñedos de nuestra comunidad. Con esta intención, hemos calculado distintos índices de desequilibrio de ligamiento (LD - derivado de la terminología en inglés: Linkage Disequilibrium) que tratan de cuantificar el grado de asociación no aleatoria de alelos de genes diferentes en una población que se reproduce al azar y asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg en cada locus.

Hay varias causas que pueden determinar la existencia de LD en una población: la genealogía de la propia población, la mutación, la deriva genética, la selección, la mezcla de poblaciones. En una población en la que el apareamiento se produce al azar, incluso para *loci* localizados en el mismo cromosoma el LD tiende a cero con el tiempo como consecuencia de la recombinación y de la segregación independiente de los cromosomas. En poblaciones que se reproducen en mayor o menor medida de forma asexual se detectan valores de LD significativamente diferentes de cero, ya que tienden a producirse y a acumularse tipos clonales. El tipo de reproducción que tiene lugar predominantemente en una población tiene, por lo tanto, un impacto muy importante en el LD que se detecta en una población dada. Siendo así, la estimación del LD que se detecta en una población puede proporcionar información sobre el tipo de reproducción predominante entre los individuos de la misma. En las poblaciones de microorganismos, en particular en aquellos casos en los que o no existen o no

resultan fácilmente observables las estructuras sexuales, el estudio de la estructura genética de las poblaciones y la estimación del LD proporciona una herramienta muy útil para inferir el tipo de reproducción característico en sus poblaciones.

En este trabajo hemos estimado y cuantificado la existencia de LD tanto en la población de aislados analizados en su conjunto como en cada una de las subpoblaciones establecidas en función de la zona productora en la que cada aislado fue recolectado, haciendo uso de dos tipos de análisis diferentes. En primer lugar se ha estimado en cada caso una medida del grado de asociación mediante el cálculo del valor del índice de asociación, " I_A ", y del índice " rd ", cálculos llevados a cabo utilizando el programa Multilocus v.1.3b. En segundo lugar en cada población se ha llevado a cabo un test de LD de dos *loci* para todas las combinaciones posibles de todos los *loci* considerados tomados de dos en dos.

El programa Multilocus v.1.3b permite el cálculo de varios índices de diversidad genética y también de desequilibrio de ligamiento y diferenciación de población. Permite, además, identificar subpoblaciones que no comparten polimorfismos (o sea, aisladas reproductivamente) (Agapow y Burt, 2001). Concretamente, el programa permite calcular 7 estadísticos: Número de diferentes genotipos (Genotipos), la frecuencia del genotipo más frecuente, la diversidad genotípica, la proporción de *loci* compatibles, el índice de asociación (I_A), que es dependiente según el tamaño de la población y una nueva medida de desequilibrio de ligamiento (rd), que disminuye la dependencia del tamaño de la población (Tabla 29).

El índice de asociación (I_A) es una medida tradicional del desequilibrio de ligamiento (Brown *et al.*, 1980, Maynard Smith *et al.*, 1993; Haubold *et al.*, 1998, Agapow y Burt, 2001). De forma resumida, para su estimación se calcula la "distancia entre cada dos aislados" (número de *loci* en los que cada dos aislados difieren) entre todos los pares de individuos que pueden considerarse y a continuación la varianza de las distancias observadas es comparada con la esperada si no existe desequilibrio de ligamiento. Un valor del Índice de Asociación I_A igual a cero supone que no hay desequilibrio de ligamiento y se asume que ocurre reproducción sexual y que la población es panmíctica. Si existe desequilibrio de ligamiento el Índice I_A toma valores distintos de cero, crecientes en función del grado de desequilibrio. Ello supone que la población no es panmíctica y que, al menos en cierta medida, la reproducción es asexual. El cálculo de rd introduce factores correctores para reducir el efecto y la dependencia del tamaño de la población. rd toma valores entre un valor mínimo de "0", indicativo de que no hay LD y de que la población es panmíctica, adquiriendo valores crecientes en función del grado de LD y hasta un valor máximo de "1".

En nuestro análisis se utilizó la matriz corregida de clones (sin clones) para calcular los índices indicados, con el objeto de evitar los efectos derivados de la presencia de genotipos duplicados (Ma and Michailides, 2005). En todos los grupos (poblaciones) analizadas se observó un desequilibrio de ligamiento significativo (ver Tabla 29) ya que en todos los casos el índice de asociación (I_A) fue significativamente diferente de cero ($P < 0,01$ en todas las poblaciones consideradas). La misma situación fue observada cuando los *loci* monomórficos

fueron eliminados de nuestro análisis. La población de Cigales presentó un I_A igual a 2,74 y la población de Ribera del Duero un valor igual a 11,05. Hay que llamar la atención sobre el valor obtenido en la DO de Cigales. Es un valor muy cercano a cero. Esto puede ser consecuencia del pequeño tamaño de la población (15 individuos). En el análisis llevado a cabo con la población total el valor de I_A fue igual a 6,14. Los valores de r_d obtenidos son en todos los casos significativamente diferentes de "0", lo que indica una desviación de la situación de panmixia: para la población total el valor fue de 0,0424 y varió en las distintas poblaciones entre un valor mínimo de 0,0267 para Rueda y un valor máximo de 0,0771 para Ribera del Duero.

Tabla 29. Estimación del índice de asociación I_A y del índice r_d como medidas de desequilibrio de ligamiento en las poblaciones de *B. cinerea*.

Grupo muestreado sin clones	Genotipos	Proporción de Loci Compatibles	I_A	r_d
Matriz total	270	0,0546756	6,14308 (P-value < 1,0)	0,0424412
DO				
Arribes	64	0,490201	3,62528 (P-value < 0,01)	0,0271666
Cigales	15	0,849128	2,74969 (P-value < 0,01)	0,0275555
Ribera del Duero	70	0,284564	11,0599 (P-value < 0,01)	0,0771636
Rueda	36	0,663893	3,28571 (P-value < 0,01)	0,0267147
Sierra de Salamanca	41	0,483848	7,23369 (P-value < 0,01)	0,0531738
Toro	44	0,522148	6,59455 (P-value < 0,01)	0,0482738

EL análisis de LD de dos *loci* se basa en la aplicación de la prueba de chi-cuadrado comparando las frecuencias observadas y esperadas de los cuatro genotipos posibles para todas y cada una de las posibles parejas de *loci* polimórficos que es posible considerar entre todos los *loci* polimórficos analizados en cada población. La hipótesis nula es la de existencia de equilibrio de ligamiento. La Tabla 30 recoge los porcentajes de pares de *loci* en las distintas poblaciones en las que se detecta una desviación significativa ($P < 0,05$) de la situación de equilibrio de ligamiento. En una población completamente panmíctica se espera que menos de un 5% de las posibles combinaciones de pares de *loci* muestren LD (Xu, 2006). Los resultados presentados en la Tabla 30 muestran que en la mayoría de las poblaciones consideradas atendiendo al factor geográfico (D.O.) se detectan valores de LD significativos. El número de combinaciones de pares de *loci* en las que se cuantifican diferencias significativas entre los valores observados y los valores esperados en caso de equilibrio de ligamiento oscila entre un 4,06% en el caso de la población de Cigales, única población en la que podría deducirse que no se observa LD, y un 31,64% en el caso de la población de Ribera del Duero. El análisis de la Tabla 30 proporciona, por lo tanto, evidencias de que en las poblaciones consideradas se observa una desviación notable de la situación esperada en caso de panmixia, excepto en el caso de la población de Cigales.

Tabla 30. Prueba de dos *loci* de LD en las poblaciones analizadas. Para cada población se ha calculado el número de combinaciones de pares de *loci* en las que se obtienen evidencias de LD.

Población	Nº de individuos	Número de loci polimórficos	Número de combinaciones	Nº y % de combinaciones que muestran LD
1 - Arribes	64	143	6768	1692 (15,14%)
2 - Cigales	15	103	1816	454 (4,06%)
3 - Ribera del Duero	70	148	13912	3478 (31,12%)
4 - Rueda	36	131	4612	1153 (10,31%)
5 - Sierra de Salamanca	41	143	8000	2000 (17,89%)
6 - Toro	44	148	7888	1972 (17,64%)
Total				

Los dos tipos de análisis de LD llevados a cabo, el análisis multilocus y el análisis de dos *loci*, proporcionan resultados coherentes. Ambos proporcionan evidencias de la existencia de LD en todas las poblaciones analizadas. Esto supone que en las poblaciones naturales de *B. cinerea* recogidas en las distintas D.O de la Comunidad de Castilla y León la reproducción asexual tiene lugar y que ésta tiene un papel importante a la hora de configurar la estructura genética de la población. No obstante, los valores de los índices correspondientes no son muy elevados, lo que indica que las poblaciones no son exclusivamente clonales.

3.4 - TRANSPOSONES

En *B. cinerea* se ha descrito la presencia de transposones (Diolez *et al.*, 1995, Levis *et al.*, 1997, Daboussi, 1997). Se considera que la actividad de los transposones es una fuente de variación genética que, al menos en cierta medida, determina y explica la variabilidad fenotípica observada en las poblaciones naturales del patógeno. Aunque el hongo presenta una fase sexual, ésta raramente se detecta en la naturaleza. Es necesario, por lo tanto, considerar mecanismos adicionales o alternativos que contribuyan a explicar la variación detectada en las poblaciones naturales de *B. cinerea*. La actividad de transposones es uno de los posibles mecanismos a tener en cuenta. Estas razones hicieron despertar nuestro interés en investigar la presencia de transposones en nuestra colección y en determinar y comparar la posible organización y estructura de nuestra población de aislados de campo del patógeno en relación con la presencia o ausencia de transposones con las de otras poblaciones naturales del patógeno caracterizadas previamente en otros ámbitos geográficos y obtenidas a partir de otras especies de plantas huésped (Muñoz *et al.*, 2002, Isenegger *et al.*, 2008b, Muñoz *et al.*, 2010).

Decidimos evaluar concretamente la presencia/ausencia de dos elementos transponibles: *Boty* y *Flipper*, en nuestra colección de aislados. Estudios llevados a cabo en otras poblaciones del patógeno han indicado que existen aislados de *B. cinerea* que presentan solamente el elemento transponible *Boty* (denominados tipo *Boty*), aislados que presentan sólo el elemento transponible *Flipper* (denominados tipo *Flipper*), aislados que tienen ambos elementos transponibles (denominados *Transposa*) y aislados que no tienen ningún elemento (denominados *Vacuma*) (Isenegger *et al.*, 2008b). En estudios previos se han utilizado combinaciones de cebadores específicas que permiten amplificar mediante PCR un fragmento de ADN derivado de cada uno de los dos tipos de transposones como herramienta de diagnóstico de la presencia o ausencia de cada uno de ellos. El par de oligonucleótidos (F300 y F1550) permite amplificar un fragmento de ADN de 1,250 bp de *Flipper* (Levis *et al.*, 1997). Por su parte, la combinación de cebadores *Boty* B4 y *Boty* R4 (ver Materiales y Métodos, sección 7) permite amplificar un fragmento de ADN de 510 bp derivado de *Boty* (Diolez *et al.*, 1995).

Para detectar la presencia de uno y otro transposon en nuestros aislados de campo llevamos a cabo reacciones de PCR utilizando como ADN molde, ADN genómico de cada aislado (se utilizaron las mismas muestras de ADN utilizadas para la detección del marcador molecular tipo SCAR que nos ha servido como herramienta de identificación molecular y también utilizadas en nuestro análisis de AFLPs) en reacciones independientes que incluían bien la combinación F300 - F1550, bien la combinación *Boty* B4 - *Boty* R4 de cebadores (las condiciones de PCR utilizadas en cada caso son las indicadas en Materiales y Métodos, sección 7).

La Figura 39 muestra los resultados obtenidos en un experimento representativo llevado a cabo con 20 aislados de *B. cinerea* (ver pie de Figura). La Figura presenta un gel de electroforesis en el que se separan los productos de PCR obtenidos en las reacciones de

amplificación correspondientes llevadas a cabo en presencia de la combinación de cebadores F300 y F1550. El análisis de este gel indica que las cepas 369 (1), 372(3), 375(4), 376(5), 377(6), 378(7), 380(8), 381(9), 394 (11), 399 (13), 400 (14), 403 (15), 407 (16), 412 (18), 413 (19) tienen Flipper, mientras que las cepas 371 (2), 397 (12) y 409 (17) no lo tienen. En las reacciones control (carreras 10 y 20), como era de esperar, no se amplifica ningún producto.

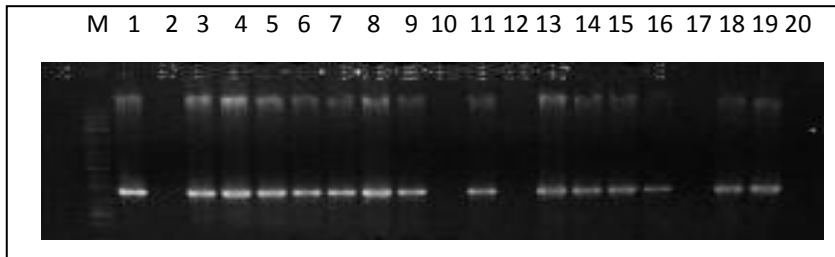


Figura 39. Gel de electroforesis en el que se separan los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos F300 y F1550 utilizando como ADN molde ADN de los aislados 369 (1), 371(2), 372(3), 375(4), 376(5), 377(6), 378(7), 380(8), 381(9), 394 (11), 397 (12), 399 (13), 400 (14), 403 (15), 407 (16), 409 (17), 412 (18), 413 (19) Las carreras (10) y (20) corresponden a reacciones control llevadas a cabo en ausencia de ADN molde (sustituido por ddH₂O). M es un marcador de tamaño de 1 kb ladder (Biotools).

La Figura 40 presenta un gel de electroforesis representativo del análisis llevado a cabo con todos los aislados estudiados utilizando en este caso la combinación de cebadores *BotyB4* y *BotyR4*. Puede comprobarse que todos los aislados analizados (los mismos que fueron probados en la Figura 39) contienen el elemento transponible *Boty*. Los controles (carreras 10 y 20) en los que el ADN genómico ha sido sustituido por agua, no presentaron ninguna banda de amplificación.

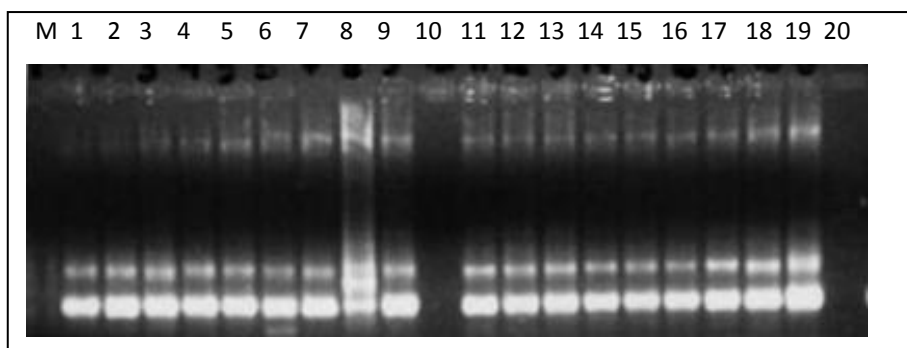


Figura 40. Gel de electroforesis obtenido en el ensayo con los oligonucleótidos que amplifican el elementos transponible *Boty*. Los ADNs utilizados en este ensayo son los mismos que los presentados en la Figura 39.

Siguiendo esta metodología se analizaron los 285 aislados objeto de estudio en nuestro trabajo y cada aislado fue incluido en la clase *Boty*, *Flipper*, *Transposa* o *Vacuma*

según fuera posible detectar mediante PCR únicamente el transposon *Boty*, únicamente el transposon *Flipper*, ambos transposones simultáneamente o ninguno de los dos. Los resultados del recuento se presentan en la Figura 28. No se identificó ningún aislado carente de transposones. La mayoría de los aislados son portadores del transposon *Boty*, bien como único tipo de transposon (aislados de tipo *Boty* - 189 aislados), bien junto con el transposon *Flipper* (aislados de tipo *Transposa* -95 aislados). Sólo dos aislados resultaron ser portadores sóloamente del transposon *Flipper*.

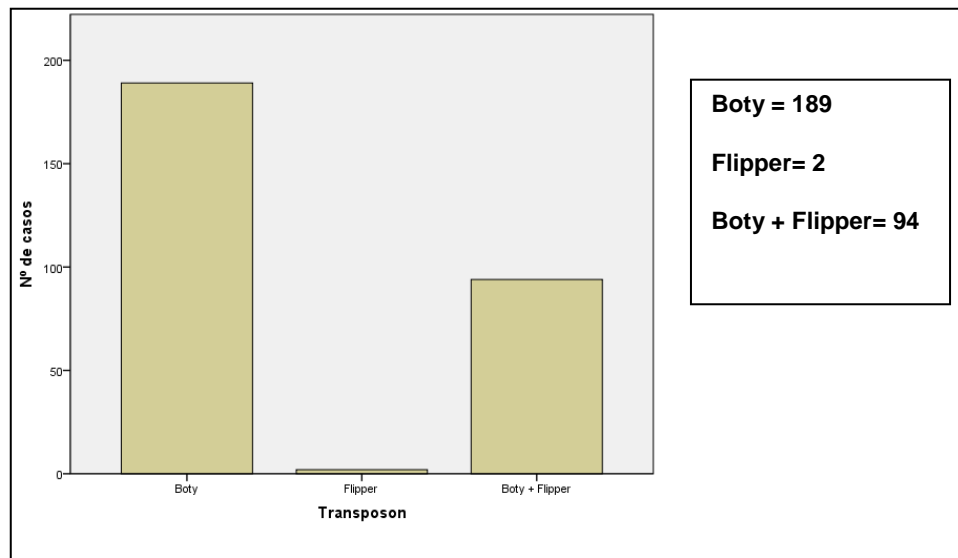


Figura 41. Distribución de los aislados de campo de *B. cinerea* obtenidos en los viñedos de Castilla y León en las clases establecidas en función de los elementos transponibles que cada aislado posee.

Del análisis de la constitución de estas clases de aislados establecidas en función de la presencia de transposones se deriva una observación clave. Dado que los aislados incluidos en el Grupo I de *B. cinerea* son todos ellos aislados de tipo *Vacuma*, carentes de transposones, nuestro análisis nos permite proponer que todos los aislados recogidos en los viñedos de las diferentes zonas productoras consideradas en este trabajo son aislados pertenecientes al Grupo II.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

BOTRYTIS CINEREA EN LOS VIÑEDOS DE CASTILLA Y LEÓN

La vid es un cultivo estratégico en Castilla y León. En la actualidad los factores que limitan de manera más importante la producción de vid en nuestra Comunidad se derivan de los efectos de patógenos en campo. *B. cinerea* es uno de los principales patógenos de la vid y en Castilla y León afecta de manera muy notable a este cultivo. La prensa recoge con frecuencia esta problemática, sobre todo en fechas próximas a la vendimia. Si las condiciones climáticas lo favorecen, *B. cinerea* puede tener efectos devastadores y determinar pérdidas de hasta el 50-70% de la cosecha. Todos los viticultores reconocen la importancia del problema y muchos de ellos realizan 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, sobre todo, menos aceptada. 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, saludable y respetuosa con el medio ambiente.

Frente a este tipo de prácticas más convencionales se hace necesario desarrollar procedimientos y métodos de control de las enfermedades en campo alternativos, lo que exige profundizar en el conocimiento de la biología del patógeno y de la dinámica de sus poblaciones. Estas consideraciones cobran especial importancia cuando se trata de patógenos que muestran una gran diversidad y adaptabilidad, como es el caso de *B. cinerea* y de sus poblaciones naturales. Estos aspectos han atraído la atención y el interés de numerosos investigadores y empresas que han centrado sus esfuerzos en la caracterización de las poblaciones naturales del patógeno en muy distintas regiones del planeta y sobre huéspedes muy distintos. En este trabajo nos hemos planteado profundizar en la caracterización de las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León, en particular evaluando la diversidad fisiológica y genética existente en las mismas y determinando la forma en que esta diversidad genética se estructura. Trabajos abordando estos aspectos con mayor o menor amplitud se han descrito en poblaciones de *B. cinerea* en otras áreas geográficas del planeta (Thompson and Latorre, 1999; Alfonso *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2003; Ma and Michailides, 2005; Fournier *et al.*, 2005; Fournier and Giraud, 2008; Karchani-Balma *et al.*, 2008; Mirzaei *et al.*, 2008; Isenegger *et al.*, 2008 a, b; Muñoz *et al.*, 2010; Tanovic *et al.*, 2009; Rajaguru *et al.*, 2010).

Sorprende el hecho de que, reconocida la importancia de la podredumbre gris causada por *B. cinerea* sobre numerosos cultivos, pero de forma particular sobre la vid, y la incidencia que efectivamente muestra este patógeno en una región productora de vid tan importante como Castilla y León, no se haya llevado a cabo previamente ningún estudio ni fisiológico ni genético sobre las poblaciones del patógeno presentes en nuestros viñedos. Debemos reconocer que tampoco son numerosos los estudios llevados a cabo previamente sobre aislados de cualquier

otro huésped, ni en nuestra Comunidad Autónoma ni en todo el territorio nacional en su conjunto. A este respecto cabe destacar los estudios realizados sobre poblaciones de aislados de *B. cinerea* recogidos en invernaderos en el sur de España (Alfonso *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta la búsqueda en la literatura científica que hemos realizado, consideramos que el nuestro constituye el primer trabajo sobre las poblaciones naturales de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León en el que se aborda la caracterización fisiológica y genética de las mismas.

Para la recolección de muestras hemos seleccionado áreas productoras importantes y de gran tradición vitivinícola de nuestra Comunidad Autónoma (no todas, ciertamente, dadas nuestras limitaciones materiales). Se trata de las D.O. Ribera del Duero, Toro, Cigales y Rueda. Hemos incluido también dos áreas desde un punto de vista cuantitativo quizás menos relevantes, pero muy interesantes para nosotros por tratarse de dos áreas localizadas en nuestro entorno más próximo, en la provincia de Salamanca, y en las que del cultivo de la vid se está derivando una notable actividad económica local. Son dos áreas geográficas de interés, además, porque en ellas se mantienen algunas variedades de vid autóctonas, muy poco utilizadas, y cultivadas en muchos casos de forma artesanal. Se trata de la D.O. Arribes del Duero y la Zona de Vinos de la Tierra Sierra de Salamanca. Dentro de estas zonas productoras hemos seleccionado una serie de municipios representativos y dentro de ellos una serie de viñedos representativos, muchos de los cuales han sido visitados en varias ocasiones. Fruto del trabajo de muestreo llevado a cabo se ha generado una colección numerosa de aislados obtenidos cubriendo un espacio geográfico amplio y en el que se ha trabajado con un buen número de variedades de vid, desde las más comunes y comerciales hasta algunas cultivadas de forma muy localizada y restringida. Tenemos así aislados de *B. cinerea* recogidos sobre las variedades Garnacha, Juan García, Malvasía, Rufete, Tempranillo, Tinta de Toro, Verdejo, Viura, Bruñal, Gajo Arroba, Sauvignon Blanc, Tempranillo Blanco, Moscatel, Pedro, Merlot, Malvec, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Albillo, Petit Verdó, Syrah, Jeromo, Bastardillo, Jerez Palomino, Maldón, Pipajo, Mazuelo) (Tabla 5).

Nuestro trabajo demuestra la **gran incidencia de *B. cinerea* en los viñedos de Castilla y León**. En la campaña de 2007, el 84% de los racimos recogidos y analizados presentaron propágulos de *B. cinerea* que pudimos recuperar y purificar. La incidencia dentro de las D.O. varió desde un 75% en la D.O. Cigales hasta el 100% en la D.O. Rueda (Tabla 6). Consideramos que el hecho de que en la D.O. de Cigales hayamos obtenido datos indicativos de una incidencia menor es consecuencia del hecho de que el número total de racimos analizados procedentes de sus viñedos fue más reducido (por problemas ajenos a nuestra voluntad que nos impidieron recolectar un mayor número de racimos en las fechas previstas de visita). En cualquier caso los datos obtenidos en conjunto demuestran la muy elevada, y generalizada, presencia de *B. cinerea* en los viñedos de nuestra Comunidad Autónoma. No podemos dar datos de la campaña del año 2002 ya que en aquella ocasión no se llevó a cabo un recuento preciso del número de racimos totales a partir de los cuales se trató de purificar el patógeno. No obstante, las visitas que se llevaron a cabo entonces y las inspecciones visuales

que se realizaron fueron también indicativas de una elevada incidencia. Del total de racimos recogidos en la campaña del año 2007 que resultaron estar infectados por *B. cinerea*, un 83% mostraban síntomas en campo y en los mismos fue posible detectar la presencia del patógeno de forma visual durante la visita al viñedo. Un total de 31 racimos (el 17% de los racimos infectados) resultaron ser racimos asintomáticos en los que *B. cinerea* estaba presente pero aún no se habían hecho evidentes los síntomas de infección.

Después de obtener los aislados de campo a partir de los racimos, las que hemos denominado en este trabajo "cepas madre", procedimos a obtener un cultivo monospórico de cada una de ellas con el objeto de disponer de un material homogéneo con el que llevar a cabo los análisis de caracterización fisiológica y genética que estábamos interesados en realizar. Con muestras de DNA obtenidas a partir de estos cultivos monospóricos comprobamos que las cepas aisladas pertenecían realmente a la especie *B. cinerea* mediante la confirmación de la presencia de un marcador SCAR específico de este organismo (Rigotti *et al.*, 2002). Todos los aislados caracterizados fisiológica y genéticamente en este trabajo han sido confirmados como aislados de la especie *B. cinerea* mediante esta herramienta molecular.

La incidencia de *B. cinerea* en los racimos analizados en 2007 fue muy notable, como hemos indicado. Debemos destacar algunas consideraciones adicionales. En la mayor parte de los racimos analizados y en los que se purificó *B. cinerea*, fue posible obtener varios aislados. En algunos casos, del mismo racimo se obtuvieron aislados idénticos, considerados clones. Es el caso de muchos de los aislados que integran las parejas, y el grupo de tres aislados, de clones identificados en nuestro estudio y descritos en la sección 3.2.2.1. En estos grupos, el mismo aislado fue purificado a partir de micelio ya evidente en el racimo en campo y también a partir de bayas asintomáticas procedentes de ese racimo (por ejemplo, los aislados 547 y 549, o los aislados 430 y 431) o bien a partir de dos muestras de micelio distintas tomadas del mismo racimo (por ejemplo, los aislados 543 y 544). En algunos racimos asintomáticos también fue posible purificar el mismo aislado a partir de bayas diferentes (por ejemplo, los aislados 275 y 277). Estas observaciones que describimos en los diferentes casos que indicamos, son consecuencia de situaciones que cabe esperar en nuestro análisis, ya que en un racimo dado es posible presumir que el mismo "tipo genético" pueda estar presente en bayas diferentes dada la capacidad de esporulación del patógeno (bayas diferentes infectadas por esporas idénticas procedentes del mismo aislado -tipo genético- del patógeno). Pero en la mayor parte de los racimos analizados se han purificado, efectivamente, varios aislados y éstos son genéticamente diferentes. Y esta es la situación más frecuente, como se desprende del análisis de la Tabla 5 y del dendrograma de la Figura 33. **Estas observaciones constituyen indicaciones claras de que en los racimos de nuestros viñedos se están produciendo con mucha frecuencia INFECCIONES MÚLTIPLES**, infecciones que pueden manifestarse de forma más o menos evidente (y, en algunos casos, siendo aparentemente asintomáticas). Una situación similar ha sido descrita en uno de los pocos trabajos en los que estas cuestiones han sido analizadas con anterioridad, concretamente en racimos de vid en los viñedos franceses (Giraud *et al.*, 1997). En este contexto cabe destacar también que, en algunos casos, a partir

de una cepa madre se han obtenido luego cultivos monospóricos fenotípicamente diferentes, observaciones indicativas de que la cepa madre, o no era un cultivo puro, o siendo un cultivo puro, el aislado correspondiente es en realidad un heterocarionte que puede generar esporas de tipos diferentes. Todas estas observaciones y consideraciones dibujan un escenario, una interacción planta-patógeno, que constituye un sistema realmente complejo que exige un análisis detallado y en profundidad.

Fruto de las recolecciones realizadas durante las campañas 2002 y 2007 se ha generado una colección de aislados de campo de *B. cinerea* recogidos sobre distintas variedades de vid integrada por 626 aislados (199 aislados de la campaña 2002 y 427 aislados de la campaña 2007). Para la caracterización de diversidad fisiológica y genética en las poblaciones del patógeno de los viñedos de nuestra Comunidad Autónoma se seleccionó una población de trabajo integrada por una muestra representativa (en total por 316 aislados, indicados en la Tabla 9). Esta población fue seleccionada tratando de mantener un número de individuos apropiado para un análisis poblacional atendiendo al factor geográfico (D.O.). Bonin y colaboradores proponen que la utilización de poblaciones integradas por al menos 14-30 individuos cada una es apropiado para este tipo de estudios (Bonin *et al.*, 2007). En nuestro caso la población de Cigales está ciertamente menos representada que las otras D.O. consideradas, pero de acuerdo con las recomendaciones citadas, el número de individuos es suficiente para el trabajo estadístico propuesto. También hemos llevado a cabo el análisis poblacional atendiendo al factor variedad de vid a partir de la cual se han efectuado los aislamientos. En este caso se han seleccionado las variedades para las cuales el número de aislados disponibles era más elevado (descartando en este análisis los aislados analizados atendiendo al criterio D.O. que se derivan de variedades para las cuales el número de aislados disponibles era muy bajo) pero, ciertamente, atendiendo a este factor el número de poblaciones con un número limitado de aislados es mayor. No obstante creemos que es posible extraer información de interés derivada de nuestro análisis.

DIVERSIDAD FISIOLÓGICA DE *B. CINEREA*

B. cinerea es reconocido en el mundo de la fitopatología como un patógeno generalista con un amplísimo rango de huéspedes y que muestra una enorme variabilidad fisiológica y genética (revisado en Jarvis, 1977; Elad *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2007). Nuestro trabajo ha tenido como objetivo fundamental valorar esta diversidad fisiológica y genética en las poblaciones de *B. cinerea* recogidas en los viñedos de nuestra comunidad autónoma. El aspecto de la fisiología del patógeno que nos interesa de una manera particular es su capacidad de infectar a varias especies de plantas hospedadoras, en particular a la vid y concretamente a las principales variedades blancas y tintas cultivadas en Castilla y León. El manejo de la vid en experimentos de inoculación a gran escala presenta varios problemas derivados fundamentalmente de la estacionalidad del cultivo y de la dificultad para disponer de cantidades importantes de material vegetal (en nuestro caso hojas) cultivado en condiciones naturales y no tratado con agentes químicos. Es por esta razón que para llevar a cabo un primer análisis de las diferencias de agresividad sobre el huésped, decidimos evaluar la agresividad de los aislados recogidos a partir de vid sobre judía. Disponíamos de un segundo huésped de fácil manejo y que podríamos cultivar a gran escala en condiciones de invernadero, el tomate. Como hemos podido comprobar *a posteriori*, la correlación de la agresividad sobre vid (en general para todas las variedades) es siempre más alta con la agresividad sobre judía que con la agresividad sobre tomate. Por lo tanto, a la hora de obtener una primera indicación del comportamiento que pudieran tener sobre vid el conjunto de aislados obtenidos, la judía es un huésped indicador más apropiado.

El análisis que hemos llevado a cabo con los 316 aislados de campo cuya agresividad se ha evaluado sobre judía y el establecimiento de las clases "fisiológicas" (fenotípicas) que para esta característica hemos propuesto nos permite visualizar de forma sencilla y muy ilustrativa la distribución de la expresión (o manifestación) de esta característica en la población. Y la distribución que se deduce del histograma resultante se aproxima mucho a una **distribución de tipo normal**. Es posible proponer entonces que **el carácter "agresividad sobre judía" es un carácter cuantitativo, de variación continua, en cuya determinación participan varios genes**. Por lo tanto, nuestras observaciones proporcionan evidencias adicionales que apoyan la consideración de la patogenicidad de *B. cinerea* como un carácter ciertamente complejo que se configura derivado de la acción de numerosos factores de patogenicidad (Amselem *et al.*, 2011).

El estudio de la distribución de la expresión del carácter en la población nos permite hacer algunas reflexiones de interés. La curva de distribución no es una curva absolutamente simétrica (las clases más frecuentes -VIII, IX y X- no son las clases que muestran los valores intermedios de expresión del fenotipo, que corresponderían a las clases VI, VII y VIII). Ello es consecuencia fundamentalmente de que los valores de expresión del carácter que podemos

considerar "menores" muestran un mayor grado de dispersión, es decir, se distribuyen en un mayor número de clases fenotípicas, cada una de ellas integrada por un número reducido de individuos. Y llama la atención que la clase de fenotipo más extremo, la Clase 0, sea más numerosa que las clases inmediatamente adyacentes (Clases I a IV). Esta situación introduce una segunda distorsión en la curva que, aunque es difícil de valorar porque el número total de individuos analizados no es muy grande (población de 316 individuos) y las clases extremas poco numerosas, pudiera interpretarse como indicativa de la existencia de una segunda población, muy poco numerosa, de individuos caracterizados por mostrar un fenotipo particular, distinto del de la población en su conjunto. En esta población se incluirían los miembros de la Clase 0, concretamente 7 aislados, los identificados con los códigos 368, 369, 509, 530, 531, 572 y 576, (y quizás pudiéramos pensar también en los miembros de las Clases I, II, III y IV), que resultan mostrar el mismo comportamiento (agresividad) que el aislado de *B. aclada*, patógeno específico de cebolla, utilizado como control en este trabajo y que, como es de esperar, en función de su comportamiento sobre judía también resulta incluido en esta Clase 0. Pudiera pensarse que estos aislados son aislados pertenecientes a una especie del género *Botrytis* diferente con una especificidad de huésped que excluye a la judía como planta susceptible, pero no parece ser el caso puesto que en todos estos aislados hemos amplificado el marcador tipo SCAR descrito por Rigotti *et al.*, (2002) característico de *B. cinerea*. Se trata entonces de aislados de la especie *B. cinerea* incapaces absolutamente de infectar la judía. Sobre la naturaleza y la constitución genética de este grupo de individuos haremos algunos comentarios adicionales más adelante en la discusión.

Es interesante considerar conjuntamente la curva de distribución del carácter "agresividad sobre judía" y la curva de distribución del carácter "capacidad de crecimiento saprofito sobre medio MEA". Esta última también parece una curva de distribución normal pero, como en el caso anterior, no es una curva simétrica. Las clases más frecuentes son clases que corresponden a valores de expresión fenotípica elevada, por lo que el máximo de la curva está desplazado de los valores centrales de expresión. También como en el caso anterior, se identifica un número reducido de aislados dispersos en un número relativamente elevado de clases fenotípicas, todas ellas en la cola de la curva próxima al extremo inferior de variación del carácter. Concretamente un 5,37% de los aislados analizados (17 de 316) se distribuyen muy dispersos en las 8 clases fenotípicas (Clases 0 a VIII) -más del 50% de las clases establecidas- de valores de expresión menor. También ahora, la clase fenotípica con el valor de expresión mínimo incluye un número de individuos mayor que las clases inmediatamente adyacentes. La similitud de ambas curvas es, por lo tanto, notable.

Observamos que las dos curvas muestran un aspecto similar en el extremo inferior del rango de expresión de un carácter y otro. Ello es debido en buena medida a que los mismos aislados integran las clases fenotípicas correspondientes en un caso y otro. Así, todos los aislados incluidos en las Clases I a V de crecimiento saprofito están incluidos en las Clases 0, I y II de agresividad sobre judía, excepto el aislado 508 que se incluye en la Clase IV (también de aislados poco agresivos). Es decir, y como es de esperar, todos los aislados que son

"saprofitos pobres o de crecimiento muy limitado" son aislados "avirulentos o muy poco agresivos" sobre judía. Pero la observación a la inversa no se cumple, ya que no todos "los aislados avirulentos o poco agresivos" sobre judía crecen de forma limitada sobre medios sintéticos. Por ejemplo, los aislados 509 y 572 (Clase 0), 371 (Clase I) y 446 y 515 (Clase II) tienen una capacidad de crecimiento saprofítico muy notable. En estos aislados podemos deducir que la incapacidad para infectar judía tiene su origen en la no disponibilidad de factores que le permitan o utilizar los sustratos nutritivos que debería obtener a partir del huésped, o evitar las defensas que el huésped activa en respuesta al ataque del patógeno, pero no en limitaciones nutricionales de carácter general. Esta consideración hace interesantes a estos aislados en posibles estudios futuros.

Como indicábamos anteriormente, el hecho de que la curva de distribución del carácter "agresividad sobre judía" muestre dos máximos, aunque uno tenga una frecuencia muy baja, podría indicar la coexistencia de dos tipos distintos, o dos poblaciones diferentes, en la muestra analizada. La misma situación se observa en relación con el carácter "crecimiento saprofítico", lo cual es lógico puesto que, como hemos visto, los aislados con menor capacidad de crecimiento saprofítico son los menos agresivos sobre judía. Recordemos que todos los aislados incluidos en las Clases I a V de crecimiento saprofítico están incluidos en las Clases 0, I y II de agresividad sobre judía (excepto el aislado 508 que se incluye en la Clase IV). Si estos aislados constituyeran una población uniforme integrada por individuos de características similares deberíamos esperar encontrar un mayor grado de similitud (proximidad) genética entre los mismos que con el resto de la población. El análisis de las relaciones filogenéticas presentadas en la Figura 33 indica que éste no es el caso y que los integrantes de estas clases fenotípicas, bien aquellos de escasa agresividad sobre judía, bien aquellos de escasa capacidad de crecimiento saprofítico, no se agrupan de forma significativa, encontrándose dispersos en el dendrograma construido en función de las similitudes genéticas. Además, como hemos comentado, algunos de los aislados poco agresivos sobre judía son buenos saprofitos. Los dos grupos, aunque comparten algunos miembros, no son totalmente coincidentes. Por lo tanto, el fenotipo "poco agresivo sobre judía y pobre saprofito" no es característico de una clase genotípica particular que podamos identificar en nuestro análisis genético. Sin embargo, como comentaremos más adelante, el análisis genético que hemos llevado a cabo sí nos ha permitido identificar una población marcadamente diferente en términos genéticos, cuya constitución puede explicar, al menos en parte, el aspecto de la curva de distribución de ambos caracteres, particularmente en relación con la del carácter agresividad sobre judía.

El análisis llevado a cabo indica que en relación con las dos características analizadas la población de trabajo muestra una gran diversidad fisiológica, y las herramientas estadísticas utilizadas demuestran que las diferencias observadas entre las clases fenotípicas establecidas son significativas. Podemos confirmar entonces que, al menos en relación con estas dos características, ***B. cinerea* es un organismo muy variable**. Y es que *B. cinerea* ha sido reconocido tradicionalmente como un patógeno que muestra una enorme variabilidad en características tales como la patogenicidad (Lorenz, 1983; van der Vlugt-Bergmans, 1996), la

capacidad y los patrones de crecimiento (Grindle, 1979), la producción de enzimas *in vitro* e *in vivo* (Leone, 1990; Mohavedi and Heale, 1990) o la resistencia a fungicidas que aparecen rápidamente en el campo cuando se aplican agentes químicos para proteger los cultivos (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et. al.*, 1996). Las diferencias de patogenicidad entre aislados han sido analizadas en colecciones de pequeño tamaño en relación con diferencias en la producción de formas activas de oxígeno (Edlich *et al.*, 1989; Tiedeman, 1997) o de toxinas (Reino *et al.*, 2004). Nuestros resultados apoyan la existencia de variabilidad fisiológica en el carácter patogenicidad y aportan evidencias adicionales y una cuantificación precisa de la variación en relación con su patogenicidad sobre judía. Considerando la población manejada en este trabajo en su conjunto y analizando la expresión de los dos caracteres estudiados simultáneamente, se comprueba que existe una correlación moderadamente alta entre ambas características. La existencia de esta correlación nos permite hacer dos consideraciones: (1) de forma general la capacidad de crecimiento saprofito nos permite anticipar el comportamiento que en términos de agresividad sobre judía tendrá un aislado dado, si bien ciertamente existen excepciones que nos sitúan frente al análisis de aislados particularmente interesantes (por ejemplo, aquella serie de aislados que con una capacidad de crecimiento saprofito similar muestran una agresividad sobre judía muy diferente), y (2) la variación observada en el crecimiento saprofito de los aislados explica una parte importante de la variación observada en la capacidad para infectar judía. Estas dos cuestiones tienen un notable interés desde un punto de vista práctico.

Además de la agresividad de *B. cinerea* sobre judía, en este trabajo hemos evaluado la agresividad sobre tomate y la agresividad sobre una serie de variedades representativas de vid, lo que nos permite profundizar en el análisis del carácter "agresividad" o "virulencia" de este patógeno y abordar el estudio de su naturaleza como patógeno generalista. Para este análisis hemos utilizado una muestra representativa de aislados seleccionados en función de su comportamiento (agresividad) sobre judía. Concretamente se han seleccionado 37 aislados, de los cuales 15 son aislados muy poco agresivos sobre judía (aislados del grupo A, pertenecientes a las Clases 0, I, II, III y IV), 15 son aislados moderadamente agresivos (aislados del grupo B, pertenecientes a las Clases V, VI, VII, VIII y IX) y 7 son aislados muy agresivos (aislados del grupo C, pertenecientes a las Clases X, XI, XII, XIII y XIV). Del estudio de su comportamiento sobre los huéspedes considerados se derivan varias conclusiones. En primer lugar, considerando el conjunto de aislados y el conjunto de huéspedes comprobamos que el patógeno tiene capacidad para infectar a todos los huéspedes analizados. Estas observaciones apoyan la propuesta de que *B. cinerea*, como población de individuos, es ciertamente un **patógeno generalista**. En segundo lugar, considerando cada huésped de forma particular, se comprueba que hay diferencias notables en el comportamiento de los distintos aislados. Esto supone que **sobre cada huésped hay variación en el carácter "agresividad" en *B. cinerea***, pudiendo identificar desde aislados incapaces de infectar hasta aislados muy agresivos con una gran capacidad de colonización de los tejidos que infectan. En tercer lugar, cuando se compara el comportamiento de los distintos huéspedes frente al conjunto de aislados (siempre el mismo), vemos que es un comportamiento diferente en cada

caso. Es decir, **el perfil de patogenicidad que dibuja el conjunto de aislados seleccionados sobre cada huésped es diferente y específico, lo que sugiere que cada huésped presenta una configuración particular de factores que median en la susceptibilidad/resistencia del huésped al patógeno.** En este momento es necesario indicar que el comportamiento de las tres variedades blancas, por un lado, es notablemente uniforme y que el comportamiento de las cuatro variedades tintas, por otro, también resulta notablemente uniforme.

Si nos centramos entonces en la valoración de la respuesta de los distintos huéspedes analizados, comprobamos que el comportamiento de la judía y del tomate, de una parte, es ciertamente similar, y que el comportamiento de todas las variedades de vid, de otra, es también similar. Y si valoramos el número de aislados que resultan ser incapaces de infectar judía (1) o tomate (2) y el de aislados incapaces de infectar a las distintas variedades de vid (de 9 a 12) podemos proponer que **la vid (en general) es una especie de planta huésped con un nivel de resistencia a *B. cinerea* superior al de la judía y el tomate**, una mayor resistencia que es **consecuencia**, en gran medida, **de una mayor capacidad para limitar el ingreso del patógeno** (es decir, derivada de factores que participan en las fases más tempranas del proceso de infección: el reconocimiento y la penetración). Una vez que han penetrado, los aislados "agresivos" colonizan los tejidos foliares de forma eficiente, aunque aparentemente con más lentitud que en el caso de las hojas de judía y tomate (diámetros medios de lesión dispersiva similares, pero medidos a tiempos mucho más tardíos en el caso de la vid). Quizás podamos decir que la vid también muestra un mayor nivel de resistencia a *B. cinerea* a este nivel, dificultando de alguna manera el progreso y expansión de las lesiones dispersivas, pero en este caso no disponemos de evidencias que lo indiquen con claridad porque las mediciones de los diámetros de lesión se hicieron a tiempos muy distintos.

En este contexto se presenta una observación aparentemente paradójica, ya que todos los aislados analizados han sido recogidos sobre vid y, mientras prácticamente todos los aislados analizados se muestran como agresivos sobre judía y tomate, una fracción importante de ellos son incapaces de infectar los tejidos del huésped a partir de cual fueron aislados en los experimentos de infección en condiciones controladas. Es posible considerar varias situaciones, no excluyentes, que pudieran explicar estas observaciones. Como hemos comprobado en las fases iniciales de este trabajo, son muy frecuentes las infecciones múltiples en racimos de vid (sintomáticos y asintomáticos). Y distintos aislados muestran diferencias fisiológicas muy notables. Es posible que con frecuencia se encuentren propágulos de aislados de *B. cinerea* no agresivos que están presentes sobre el material vegetal (un racimo, por ejemplo), propágulos que han sido producidos sobre un huésped susceptible más o menos próximo o sobre un sustrato nutritivo adecuado, y comportándose ahora sobre el racimo como un organismo saprofito. Es posible pensar también que algunos de los aislados purificados a partir de racimos sean aislados que infectan con facilidad tejidos florales, o los propios frutos, inmaduros y maduros, y que están presentes en los tejidos del racimo a la espera de que se produzcan las condiciones apropiadas para su desarrollo, pero que tienen limitaciones

importantes a la hora de infectar tejidos foliares en inoculaciones directas. Para valorar estas propuestas sería necesario llevar a cabo inoculaciones artificiales sobre distintos tipos de tejidos del huésped, frutos en particular, una experimentación que en este trabajo no hemos podido abordar.

Una observación particularmente importante desde el punto de vista aplicado a la hora de considerar las relaciones de resistencia/susceptibilidad de las diferentes variedades de vid a *B. cinerea* es el mejor comportamiento que de manera consistente presentan las variedades blancas sobre las variedades tintas. En general (con variaciones menores) el conjunto de aislados que no pueden infectar a la vid no infecta ni a las variedades blancas ni a las variedades tintas, pero considerando los aislados que sí son agresivos, efectivamente, en las tres variedades blancas el diámetro medio de lesión dispersiva es siempre menor que en las variedades tintas. Es decir, **las variedades blancas muestran un cierto nivel de resistencia frente a *B. cinerea***, lo cual tiene unas implicaciones muy importantes a la hora de considerar la utilización de determinados recursos genéticos para importar en las variedades de interés factores que contribuyan a mejorar la respuesta frente a *B. cinerea*.

Si nos centramos ahora en el análisis del comportamiento de los aislados sobre todos los huéspedes considerados en nuestro estudio, comprobamos que el criterio de clasificación y selección de aislados que hemos utilizado (agresividad sobre judía) nos permite hacer una descripción relativamente sencilla de nuestro sistema. Los aislados de los grupos C y B, los que hemos considerado como muy agresivos y moderadamente agresivos, respectivamente, sobre judía, muestran un comportamiento y unas características similares. Son todos ellos aislados con un buen crecimiento saprofítico, que infectan bien a la judía y al tomate (en menor medida los aislados del grupo B que los del grupo, C, pero también a niveles notables) e infectan a todas las variedades de vid y, en general, mejor a las variedades tintas que a las variedades blancas (cabe recordar dos excepciones, los aislados 460 y 1a, que parecen ser más agresivas sobre las variedades blancas que sobre las tintas). Creemos que estos aislados representan a una fracción mayoritaria de la población, teniendo en cuenta las clases a partir de las cuales han sido extraídos, y pueden considerarse patógenos generalistas que, aunque muestran diferencias de "grado" en cuanto a su agresividad sobre un huésped y otro, no muestran incapacidad total a la hora de infectar una diversidad de huéspedes importante.

Los aislados del grupo A conforman un grupo ciertamente más diverso y heterogéneo, integrado por aislados que tienen limitaciones de diferentes tipos relacionadas con su capacidad para infectar al huésped, y en él encontramos aislados de características peculiares que los hacen muy interesantes. Creemos que el análisis detallado, tanto genético como fisiológico, de algunos de ellos puede resultar muy informativo a la hora de "diseccionar" la patogenicidad de *B. cinerea*. De los 15 aislados de este grupo que han sido analizados, seis - 207, 375, 459, 568, 149b y 446- pueden considerarse buenos saprofitos que infectan muy pobremente a la judía y al tomate y que no infectan a la vid en absoluto. Podemos considerarlos aislados "no patógenos". La comparación de cualquiera de estos aislados, por

ejemplo el aislado 446, con un patógeno de amplio espectro que también sea un buen saprofito, por ejemplo el aislado 444, nos puede proporcionar información sobre "factores de tipo general" implicados en patogenicidad. Indicamos estos dos aislados, 446 y 444, porque efectivamente son dos aislados que tienen una capacidad de crecimiento saprofítico muy notable (y muy similar) que fueron obtenidos a partir de la misma variedad de vid en pies de planta adyacentes en el mismo viñedo y que, como hemos podido comprobar una vez realizado el análisis de diversidad genética, son dos aislados genéticamente muy diferentes.

Podemos destacar también el posible interés de los aislados 230 y 65a. Son dos aislados con capacidad de crecimiento saprofítico más bien pobre y que podemos considerar patógenos poco agresivos sobre judía y tomate. Sin embargo, son aislados con una capacidad de infectar a todas las variedades de vid muy notable, similar a la de los aislados de los grupos C y B. Es decir, se trata de dos aislados que parecen particularmente adaptados a la vid, tanto variedades blancas como tintas, y en los que su capacidad para infectar a un huésped que de forma general resulta ser más resistente a *B. cinerea*, la vid, no está relacionada con una capacidad de crecimiento saprofítico elevada.

Por último, dentro del grupo A es posible destacar el comportamiento del aislado 371. Se trata de un buen saprofito, que apenas puede infectar judía y tomate pero sí puede infectar a la vid, aunque aparentemente sólo a las variedades tintas. Nuestra pregunta llegados a este punto es: ¿podemos plantearnos la caracterización de este aislado para tratar de determinar si existen factores genéticos que median esta "especificidad"?

Los demás aislados analizados que forman parte de este grupo son aislados que, siendo poco agresivos sobre judía, o bien muestran características similares a los aislados de los grupos C y B en cuanto a sus relaciones de patogenicidad con los huéspedes considerados, o bien muestran un comportamiento irregular sobre los mismos. Su análisis y su utilidad en este contexto son más limitados.

En resumen, podemos concluir que la población de aislados de *B. cinerea* que hemos caracterizado fisiológicamente en este trabajo está integrada mayoritariamente por aislados que pueden ser considerados como patógenos generalistas que pueden infectar los tres huéspedes considerados (y en el caso de la vid, las siete variedades utilizadas en nuestro estudio), aunque muestran diferencias en el grado en que causan la infección en cada huésped particular. Pero en la población se identifican también, aunque en una proporción pequeña, aislados "no patógenos", incapaces de infectar ninguno de los huéspedes considerados, y aislados con comportamientos que permiten proponer cierto grado de adaptación a un huésped particular. El estudio detallado de algunos de estos aislados constituyen el objetivo de líneas de investigación que nos proponemos abordar en el futuro.

DIVERSIDAD GENÉTICA

Una vez llevada a cabo la caracterización fisiológica de los aislados que integran la colección seleccionada decidimos abordar la caracterización genética de los mismos con un doble objeto: (1) caracterizar genéticamente los individuos que la integran y evaluar las relaciones de similitud genética entre ellos, y (2) cuantificar la variabilidad genética existente y determinar el modo en el que esta variabilidad se estructura en las poblaciones naturales del patógeno. Hemos considerado que esta información, analizada conjuntamente con la derivada de los análisis fisiológicos, nos permitiría analizar posibles correlaciones entre fisiología y genética.

En este estudio, para evaluar diversidad genética hemos utilizado como fuente de información la detección de polimorfismos en marcadores moleculares de tipo AFLP. Este tipo de marcador es el marcador disponible en la actualidad que arroja más información sobre diversidad genética entre individuos y poblaciones. La principal limitación de este marcador se deriva de su naturaleza dominante, como consecuencia de lo cual no es posible inferir directamente el genotipo de los individuos (no es posible distinguir el genotipo homocigoto y el heterocigoto). Este hecho puede comprometer el análisis genético de poblaciones clásico basado en estadísticos F (y sus homólogos), ya que no se pueden determinar de forma directa las frecuencias alélicas (Lynch and Milligan, 1994). Esta es la mayor limitación, y de ella se deriva la principal crítica, en general de todos los marcadores de tipo dominante (AFLPs, RAPDs) en oposición a los clásicos marcadores codominantes (microsatélites y aloenzimas) cuando son aplicados a cuestiones relacionadas con diversidad genética y análisis de estructura genética de poblaciones. Pero la pérdida de información debida a la dominancia puede ser compensada por el hecho de que es posible analizar simultáneamente un gran número de *loci* (Miller, 2000), o aplicando métodos que permiten estimar las frecuencias alélicas a partir de datos genotípicos asumiendo que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (Lynch and Milligan, 1994). Por lo tanto, los datos derivados de análisis de marcadores de tipo AFLP también se utilizan muy frecuentemente para aplicar procedimientos de análisis de agrupamiento basados en métodos de cálculo de distancias de similitud (o disimilitud) genética (Beismann *et al.*, 1997; Rosendahl and Taylor, 1997; González *et al.*, 1998; Weeks *et al.*, 2000).

La naturaleza dominante de los marcadores de tipo AFLP condiciona el análisis poblacional fundamentalmente en organismos diploides. En estos sistemas los marcadores codominantes se consideran, de forma general, más apropiados (Xu, 2006). En organismos haploides, tanto los marcadores codominantes como los marcadores dominantes resultan apropiados, ya que no hay pérdida de información debido a la dominancia puesto que cada individuo posee una única copia de cada gen (o alelo). Es el caso de la mayor parte de los hongos y el caso de *B. cinerea* y de especies relacionadas en particular, sistemas en los que

estos marcadores se han utilizado previamente para llevar a cabo distintos estudios de genética de poblaciones (Moyano *et al.*, 2003; Staats *et al.*, 2007). La principal ventaja de los marcadores AFLP es que, efectivamente, resulta factible generar y procesar simultáneamente un número elevado de marcadores y, por lo tanto, de *loci*. Además, no es necesario disponer de información previa sobre la secuencia de regiones dadas del genoma de la especie de trabajo. En general son marcadores que se han utilizado con mucha frecuencia para evaluar diversidad genética intraespecífica y estructura genética de poblaciones. Todas estas razones nos han animado a aplicar esta metodología al análisis de las poblaciones naturales de *B. cinerea* recogidas en los viñedos de nuestra comunidad autónoma que hemos llevado a cabo en este estudio.

El procedimiento de detección de marcadores tipo AFLP basado en la utilización de oligonucleótidos marcados con fluoróforos, la electroforesis capilar y la detección automatizada con láser es una técnica sofisticada, costosa y muy sensible que genera una enorme cantidad de datos. Siendo una técnica tan sensible, su utilización exige una puesta a punto, hasta donde resulte factible, perfecta, así como la optimización de los procedimientos y la inclusión de los controles adecuados. Nosotros hemos invertido mucho tiempo y esfuerzo en familiarizarnos con el sistema, en ponerlo a punto y en seleccionar y procesar únicamente datos fiables. El genoma de *B. cinerea* tiene un tamaño que puede considerarse pequeño (aprox. 40 Mb). En estos casos la utilización de oligonucleótidos selectivos con una extensión de 2 nucleótidos resulta apropiada (Meudt and Clarke, 2007). Y así lo hemos comprobado en nuestro trabajo. La utilización del sistema (reactivos en forma de kit comercial) que proporciona Applied Biosystems para llevar a cabo todos los procedimientos enzimáticos, junto con la posibilidad de aplicar luego los procedimientos de electroforesis y detección utilizando también las herramientas que ha desarrollado esta empresa, ha resultado de gran utilidad y ha facilitado nuestro análisis. Y hemos podido generar perfiles que incluyen un gran número de marcadores moleculares en una población de individuos muy numerosa. Una vez generados éstos, nuestra principal preocupación ha sido la de seleccionar correctamente los marcadores que podemos considerar "buenos" y comprobar que los perfiles que obtenemos son realmente reproducibles y que no trabajamos con "falsos positivos" o con artefactos. Las recomendaciones y la experiencia ofrecidas por distintos autores (Rinehart, 2004; Bonin *et al.*, 2004; Bonin *et al.*, 2005; Meudt and Clarke, 2007; Liljander *et al.*, 2009; Pompanon *et al.*, 2005; Wooten and Tolley-Jordan, 2009) nos ha permitido seleccionar marcadores y perfiles de marcadores que consideramos garantizados. Estas recomendaciones han sido seguidas a la hora de revisar manualmente los perfiles que el sistema utilizado genera de forma automatizada, conscientes de que, aunque los procedimientos han sido optimizados, determinados artefactos sólo pueden ser detectados con una revisión precisa llevada a cabo de forma manual por el experimentador.

Una cuestión especialmente importante sobre la que hemos trabajado es el problema de la reproducibilidad. Frecuentemente en este tipo de estudios se incluye el análisis de cada individuo por duplicado (a partir de extracciones de ADN diferentes procedentes del mismo individuo), seleccionando únicamente aquellos marcadores que aparecen (o no) de forma

reproducibile en una y otra réplica (Arroyo *et al.*, 2002; Staats *et al.*, 2007). Cuando se trata de poblaciones de pequeño o mediano tamaño esta aproximación resulta factible. En poblaciones muy numerosas es una aproximación difícil de llevar a cabo. En nuestro caso hemos manejado una población integrada por casi 300 individuos. Antes de plantearnos completar todo el análisis por duplicado con la población completa decidimos evaluar la reproducibilidad de los resultados (perfiles) obtenidos con una muestra representativa integrada por 26 individuos (aproximadamente el 10% de población), con las restricciones que nuestro sistema particular debe tener en cuenta (como hemos indicado en la sección de Resultados, proponer un límite de 97% de similitud genética para considerar que dos individuos son clones, genéticamente idénticos). Nuestro trabajo demuestra que el grado de reproducibilidad que se logra con los procedimientos experimentales aplicados es muy alto, lo suficientemente alto como para que cuando trabajamos con réplicas de una serie de individuos dados obtengamos los mismos resultados sea cual sea el miembro de cada pareja de individuos que consideremos. Trabajos llevados a cabo por otros autores para determinar el grado de reproducibilidad mínimo que es posible aceptar han permitido concluir que variaciones en los coeficientes de similitud entre dúplicas entre $0,96 < CS < 1,00$ son aceptables y que ésta variación refleja el valor del total del error del sistema que es aceptable (Winfield *et al.*, 1998). Si el coeficiente de similitud entre dos muestras duplicadas es menor que 97%, entendemos que el sistema no genera reproducibilidad suficiente (Zeid *et al.*, 2003). Siendo así, desde nuestro punto de vista, los valores obtenidos en nuestros análisis son absolutamente aceptables y la conclusión derivada de nuestro trabajo es ciertamente relevante y demuestra que no es necesario llevar a cabo todo el análisis por duplicado. Por esta razón, en nuestro sistema todos los individuos de la población han sido analizados sólo una vez y posteriormente los datos obtenidos han sido revisados manualmente con criterios altamente restrictivos.

Para llevar a cabo nuestro estudio hemos generado una gran cantidad de información genética. Utilizando tres combinaciones de cebadores, y una vez descartados todos aquellos picos que en los electroferogramas pudieran ser problemáticos, hemos identificado un total de 388 marcadores susceptibles de ser analizados ($0,01 < f(a) < 0,99$) en nuestra población de partida integrada por 292 individuos que finalmente ha quedado reducida a 285 aislados autóctonos (una vez excluidos los controles externos y el único aislado de la D.O. Bierzo). De ellos, y siguiendo las recomendaciones de Bentley y colaboradores (2008) hemos seleccionado un total de 150 marcadores que aparecen en nuestra población de trabajo con frecuencias superiores a 0,05 e inferiores a 0,95. Es un número de marcadores muy grande utilizado para caracterizar una población de individuos muy numerosa, lo cual nos proporciona una sensibilidad y una capacidad de resolución en nuestro estudio muy notable.

Abordamos entonces el análisis de las relaciones de similitud genética entre individuos y el problema de la cuantificación de la diversidad genética de nuestras poblaciones. Utilizando el Coeficiente de similitud de DICE hemos generado un dendrograma con las similitudes (y, por lo tanto, las relaciones) genéticas entre aislados cuyos resultados encuentran soporte en el cálculo del coeficiente cofenético (que alcanza un valor muy elevado y que nos permite concluir

que el dendrograma generado constituye una buena representación de las relaciones de similitud entre los aislados analizados). Tanto el análisis del dendrograma obtenido como el de la representación del análisis de componentes principales realizado indican **que la gran mayoría de aislados analizados (un 97%) conforman una gran población sin una estructura evidente**, no pudiéndose apreciar una organización y agrupamiento de aislados claros ni por D.O. ni por variedad de vid (aunque como discutiremos más adelante, considerando las poblaciones como unidades operativas, sí detectamos cierta estructura en la población en su conjunto). Es interesante destacar que detectamos **un grupo de individuos muy poco numeroso que muestra diferencias genéticas muy notables con el gran grupo descrito anteriormente**. Este grupo está integrado por los aislados 577, 351, 509, 446, 400, 211, 425 y 207, y pudiendo ser considerados como aislados puente con el gran grupo, los aislados 572 y 568. Estos 10 aislados proceden mayoritariamente de las D.O. Ribera del Duero (6 de 10) y en menor medida de Sierra de Salamanca (3 de 10) y Toro (1 de 10). Llama la atención la naturaleza y constitución de este grupo, ya que de los diez aislados que lo integran, 7 están incluidos en las clases fenotípicas de menor agresividad sobre judía, las clases incluidas en el grupo de clases que hemos denominado Grupo A (clases 0 a IV), en el cual hemos identificado los aislados que consideramos más interesantes en cuanto a sus relaciones de patogenicidad sobre los distintos huéspedes utilizados en este trabajo. Sobre la naturaleza de este grupo, de esta pequeña población, plantharemos algunos elementos de reflexión más adelante.

Analizada la población en su conjunto es posible concluir que se trata de una **población con una gran diversidad genética**. Los valores obtenidos en todos los índices considerados son indicativos de una alta diversidad genética, en particular el valor de Diversidad Genotípica (G) y de Diversidad Genotípica Normalizada, alcanzando ésta un valor en la población total del 0,949. Es decir, se identifican casi tantos haplotipos en nuestra población (270) como individuos son analizados (285). El valor de la Fracción Clonal es de 5,18%. Una diversidad genotípica elevada en una población, lo que supone una elevada variabilidad genética y una gran riqueza genética, es indicativa de la ocurrencia de recombinación como proceso o mecanismo que genera variabilidad genética en esa población. Así se ha descrito en distintas especies de hongos (Schmale III *et al.*, 2006; Bentley *et al.*, 2008), entre ellas especies del género *Botrytis* (Alfonso *et al.*, 2000; Staats *et al.*, 2007). Nuestras observaciones sugieren, por lo tanto, que la reproducción sexual está teniendo lugar en las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de nuestra comunidad autónoma. No ha sido objetivo de nuestro trabajo buscar y encontrar la forma sexual de *B. cinerea*, *B. fuckeliana*, en el campo. Raramente se han descrito los apotecios de este teleomorfo en la naturaleza, lo que no quiere decir que no se produzcan cruzamientos entre cepas sexualmente compatibles de forma habitual. Aunque sean muy raras las descripciones de los cuerpos fructíferos en campo, podemos destacar que los dos tipos sexuales característicos de esta especie heterotálica aparecen representados en la naturaleza de manera equilibrada en la mayor parte de las poblaciones (revisado en Beever and Weeds, 2004), incluida la única población analizada a

este respecto en España (Delcán and Melgarejo, 2002). Disponemos de evidencias obtenidas sobre una muestra amplia de los aislados analizados en este trabajo que indican que éste es el caso también en las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León (resultados no publicados). Si bien su presencia y distribución equilibrada no presuponen que los cruzamientos se produzcan en campo, el hecho de que ambos tipos sexuales aparezcan representados y el que haya sido posible estandarizar las condiciones para la realización de cruzamientos en el laboratorio (Faretra and Antonacci, 1987; Faretra *et al.*, 1988), junto con la gran diversidad genotípica que hemos encontrado, creemos que proporcionan argumentos a favor de la **ocurrencia de reproducción sexual del hongo en el campo en los viñedos de nuestra comunidad autónoma.**

La diversidad genotípica que hemos cuantificado es muy alta, pero debemos destacar que hemos identificado una pequeña fracción clonal. Atendiendo al criterio considerado en nuestro trabajo (similitud genética superior al 97%) hemos identificado 13 haplotipos dos veces y un haplotipo 3 veces. En 13 de los 14 haplotipos representados más de una vez, los dos o los tres miembros del clon correspondiente fueron aislados a partir del mismo racimo. Sólo en un caso los dos miembros de la pareja fueron aislados a partir de racimos diferentes (y, en este caso, recogidos en puntos geográficos muy distantes). Es decir, en la mayor parte de los casos los clones se recogen a partir de materiales vegetales físicamente muy próximos. El hecho de haber realizado purificaciones directamente a partir de micelio ya visible sobre el racimo en campo y luego a partir de bayas asintomáticas del mismo racimo probablemente introduzca en nuestro estudio un factor de sobreestimación de la fracción clonal, que en cualquier caso es pequeña. No obstante, ciertamente se identifican clones. Este hecho, junto con la observación derivada del estudio del dendrograma que indica que los aislados procedentes del mismo racimo con frecuencia ocupan posiciones próximas en el mismo y junto con el reconocimiento de la capacidad de multiplicación mediante la producción de conidios asexuales característico de *B. cinerea*, son consideraciones que sugieren fuertemente **que la reproducción asexual tiene lugar en el campo, probablemente de forma preferente.** Si este es el caso, debe detectarse desequilibrio de ligamiento en las poblaciones naturales de *B. cinerea* de nuestros viñedos. Y así parece ser: tanto los datos derivados del análisis de LD de dos *loci* como los datos derivados del cálculo del índice de Asociación I_A indican que existe un nivel moderadamente alto de desequilibrio de ligamiento en la población en su conjunto y en todas las poblaciones que hemos establecido atendiendo a los criterios de D.O. y de variedad de vid de origen. La ocurrencia de asociaciones no aleatorias de alelos en la población supone que la población no es panmíctica y que, al menos en cierta medida, la reproducción es clonal.

Durante mucho tiempo *B. cinerea* ha sido considerado como una especie clonal. A lo largo de los últimos 15 años esta imagen ha ido cambiando como consecuencia sobre todo de las posibilidades de analizar la variabilidad genética de las poblaciones naturales del patógeno que se han ido generando haciendo uso de diversos marcadores moleculares. Fruto de estos trabajos se han obtenido evidencias que demuestran la gran diversidad genética existente y la determinación de unos valores de desequilibrio de ligamiento compatibles con la existencia de

recombinación sexual en las poblaciones naturales de *B. cinerea* en muy distintas áreas geográficas tales como Francia, España o Chile (Giraud *et al.*, 1997; Alfonso *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002). **Nuestro trabajo apoya esta visión según la cual ambos tipos de reproducción tienen lugar en el campo.** No obstante, los resultados obtenidos previamente en este contexto no son generalizables de manera absoluta, existiendo casos en los que los valores de LD obtenidos (mucho más elevados que los estimados en nuestras poblaciones de los viñedos de Castilla y León) son consistentes con una ausencia total de recombinación en las poblaciones analizadas, como es el caso de diferentes poblaciones de *B. cinerea* recogidas en California sobre distintas especies de plantas hospedadoras (Ma and Michailides, 2005).

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido diseñado también para tratar de determinar si las poblaciones de *B. cinerea* de nuestros viñedos presentan algún tipo de estructura genética. El factor más importante cuyo efecto queríamos valorar como agente que condiciona la estructura genética de las poblaciones es la existencia de D.O. en la comunidad autónoma y los condicionamientos en las prácticas agrícolas que esta figura administrativa impone. También nos hemos planteado el análisis del posible efecto de otros dos factores, la variedad de vid de origen de los aislados y el factor temporal (año de aislamiento). No obstante el factor más importante, y al que hemos prestado más atención, es el factor D.O.

Los análisis de evaluación de diferenciación genética atendiendo a las poblaciones establecidas por D.O. permiten determinar un valor del Coeficiente de Diferenciación indicativo de una diferenciación baja ($G_{st} = 0,06$). Es un valor que propone una diferenciación ciertamente reducida, pero no nula. Parece, por lo tanto, que **la población en su conjunto muestra un nivel importante de uniformidad pero que el factor D.O. determina o condiciona una cierta estructuración.** Quizás las restricciones al movimiento de materiales vegetales entre D.O. que se han ido imponiendo con el objeto de garantizar que se elaboran productos, en este caso, vinos, de características propias y peculiares con uvas cultivadas de viñedos seleccionados y acogidos a cada D.O. determinen un cierto nivel de diferenciación en la población. Pero, ciertamente, el grado de diferenciación que determinan es menor. **A contrarrestar y compensar este efecto de diferenciación puede contribuir la facilidad de dispersión que tienen un hongo como *B. cinerea*,** que esporula muy profusamente y cuyas esporas pueden ser diseminadas por el aire e insectos fácilmente. El **alto valor de número de migrantes** que se obtiene en nuestro análisis, que implica un movimiento de individuos notable en la población, puede estar apuntando precisamente en esta dirección. Una situación similar se deriva del análisis AMOVA. Éste demuestra que **la mayor parte de la variación total observada** en las poblaciones (un 94,8%) **tiene su origen en la variación dentro de las poblaciones** y que un porcentaje muy reducido (5,20%) de la variación tiene su origen en las diferencias entre poblaciones (las diferencias entre poblaciones son incluso inferiores cuando se trabajó con la población sin clones). Esta situación es la que se presenta en la mayor parte de las distintas poblaciones analizadas en numerosos trabajos previos. En general, el factor geográfico determina valores de diferenciación genética en las poblaciones bajos o muy bajos (Alfonso *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2005; Ma and Michailides, 2005;

Váczy *et al.*, 2008; Karchani-Balma *et al.*, 2008). Sólo cuando se han comparado poblaciones separadas por barreras geográficas muy importantes se detectan niveles importantes de diferenciación entre poblaciones, como por ejemplo en la comparación entre poblaciones recogidas sobre vid en Europa (Francia) y Chile (Muñoz *et al.*, 2002) o poblaciones recogidas sobre vid en Europa (Francia) y Argentina (Muñoz *et al.*, 2010).

En nuestro trabajo hemos tratado de valorar el efecto sobre una posible diferenciación de poblaciones de otros dos factores, la variedad de vid sobre la que los aislados fueron recogidos y el año de recogida (factor temporal). En el primer caso la población considerada fue sólo una parte de la población original analizada según el factor geográfico, puesto que a partir de algunas variedades de vid el número de aislados disponible era ciertamente reducido. Para el factor temporal todos los aislados fueron considerados. En ambos casos, el análisis AMOVA indica que el grado de diferenciación que determinan uno y otro factor es incluso menor que el que determina el factor estrictamente geográfico, en particular el factor temporal. En este último caso la fracción de variación estimada entre poblaciones es de sólo un 3% en la población con clones y de un 2,8% en la población sin clones. Es decir, **en las poblaciones de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León ninguno de los tres factores analizados (geográfico, variedad de vid de origen y temporal) tiene un impacto importante a la hora de determinar una diferenciación entre poblaciones importante y, por lo tanto, una estructura genética de la población en su conjunto. No obstante, aunque no es notable, el mayor efecto detectado corresponde al factor geográfico derivado del establecimiento de D.O.** En diferentes trabajos previos se han tenido en cuenta distintos factores y se han valorado sus efectos sobre la diferenciación de las poblaciones de *B. cinerea*. En uno de los trabajos más completos llevados a cabo a este respecto, Fournier y colaboradores valoraron los efectos del tipo de huésped a partir del cual se realizaron los aislamientos, de la presencia de elementos transponibles en los aislados o la implicación de los aislados analizados en la producción de podredumbre gris o de podredumbre noble. En relación con ninguno de estos factores pudieron detectar valores de fijación indicativos de tal diferenciación (Fournier *et al.*, 2005). Sólo evidenciaron diferenciación entre la población de aislados del Grupo I y la población de aislados del Grupo II, que constituye la diferenciación filogenética más importante establecida en *B. cinerea* y que, se ha propuesto, deriva del hecho de que el Grupo I y el Grupo II en realidad representan dos especies filogenéticas distintas (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2005).

En un trabajo posterior, Fournier and Giraud (2008) centraron su interés en determinar si es posible detectar algún grado de diferenciación genética entre aislados pertenecientes al Grupo II en función del tipo del huésped, del factor geográfico, o de la presencia o no de transposones haciendo uso de un marcador altamente polimórfico. En su investigación, los autores excluyeron los aislados del Grupo I. Con la variabilidad estimada utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélites pudieron detectar cierto grado de diferenciación en las poblaciones impuesto por el huésped, una diferenciación mínima determinada por el factor geográfico y un efecto nulo derivado de la presencia de transposones (Fournier and Giraud,

2008). Estos resultados sugieren la posibilidad de que exista un cierto grado de divergencia simpátrica por especialización (o adaptación) de huésped entre aislados de la misma especie en un patógeno generalista, en este caso *B. cinerea*. En nuestro trabajo hemos utilizado un juego de datos también muy informativo y coincidimos con estos autores en que el factor geográfico determina una cierta diferenciación, pero menor. No podemos decir nada en relación con el efecto del huésped porque sólo hemos trabajado con aislados de vid, aunque hayan sido aislados a partir de diferentes variedades. Los datos que hemos obtenido únicamente nos permiten decir que el factor "variedad de origen" tiene un efecto sobre la estructura de la población menor que el factor geográfico en la muestra de aislados analizados en nuestro estudio.

Una observación particularmente interesante de nuestro estudio se deriva de la identificación de una población integrada por un número reducido de aislados que genéticamente constituyen una población de características particulares y diferenciada de la población mayoritaria. Entre ambas poblaciones parece no haber flujo genético (detectamos un Coeficiente de diferenciación muy alto y un Índice de migración muy bajo: exactamente lo contrario de lo que observamos en la población mayoritaria). En esta población mayoritaria las evidencias obtenidas indican que hay tanto reproducción sexual como asexual. En la población minoritaria, integrada por un número reducido de individuos, es difícil obtener evidencias de la ocurrencia de reproducción sexual. No obstante, este grupo de aislados muestra una diversidad genética muy notable, lo que en principio apoyaría aquella posibilidad, máxime teniendo en cuenta que 6 de los 10 aislados que la forman proceden del mismo viñedo (es posible asumir que si la reproducción fuera exclusivamente clonal, la proximidad física a la hora de realizar los aislamientos determinaría una mayor frecuencia de recogida de aislados similares o muy similares). Asumiendo que ambas poblaciones, que ocupan el mismo espacio físico (son simpátricas) y el mismo huésped, experimentan reproducción sexual, el hecho de observar valores de flujo genético muy bajos sugiere que ambas poblaciones están aisladas reproductivamente. Esta es una situación similar a la descrita en relación con los aislados del Grupo I y del Grupo II de *B. cinerea* descritos previamente en viñedos de Francia (Fournier *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2005). Pero debemos recordar que los aislados del Grupo I carecen de transposones (son siempre de tipo *Vacuma*), y los aislados que integran la población minoritaria detectada en nuestro estudio poseen transposones, lo que nos obliga a pensar en una situación diferente. Debemos profundizar en la caracterización de este grupo de aislados, tanto genética como fisiológica, para determinar si este grupo constituye una población dentro del Grupo I, aunque presenten unas características particulares. En este contexto es interesante destacar que estos son aislados recogidos a partir de vid, pero que tienen una capacidad para infectar a los tres huéspedes evaluados muy reducida. En general los aislados del Grupo II están presentes en los viñedos tanto en primavera como en otoño y tienen una agresividad superior y un rango de huéspedes más amplio, mientras que los aislados del Grupo I se encuentran preferentemente en los viñedos en primavera y muestran una menor agresividad y un rango de huéspedes más restringido (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*,

2003, 2005). Por lo tanto, aunque poseen transposones, los aislados de nuestra población minoritaria comparten algunas características en común con los aislados del Grupo I.

Es interesante destacar que cuando hemos utilizado la herramienta que nos proporciona el programa "Structure" para realizar una estimación del número de subpoblaciones que integran nuestra población global, el análisis llevado a cabo propone que existen 7 subpoblaciones. Nosotros hemos trabajado fundamentalmente con la subdivisión de la población que establecemos atendiendo al criterio D.O., el criterio que consideramos más relevante en el contexto de este trabajo. Y se establecen 6 subpoblaciones. El hecho de que Structure identifique 7 subpoblaciones puede ser consecuencia de que esta herramienta, utilizando la información genética que maneja obtenida a partir de todos los aislados estudiados, identifica las 6 poblaciones de partida como poblaciones reales con características propias, identificando, además, con características genéticas particulares la población minoritaria que nosotros hemos detectado haciendo uso de las demás herramientas de análisis poblacional que hemos considerado en este trabajo. Esta observación proporcionaría evidencias adicionales de la presencia de una entidad poblacional diferente, muy minoritaria y de características particulares, en la población general analizada.

Aunque la población en su conjunto, una vez establecida la distinción indicada con la población minoritaria de 10 aislados, es una población sin una estructura evidente ni por D.O. ni por variedad de *vid*, y aunque las poblaciones establecidas atendiendo a un criterio y otro son muy similares entre sí, lo cierto es que algunas son más próximas genéticamente entre sí que otras, tal y como indica la estimación de las "Distancias Genéticas de Nei" entre subpoblaciones. Y el estudio del dendrograma obtenido demuestra que existe una correlación importante entre distancia genética y distancia geográfica. Todo ello indica que el factor geográfico contribuye a marcar, aunque sea débilmente, diferencias genéticas entre los individuos.

En resumen, fruto de los análisis llevados a cabo es posible concluir que las poblaciones naturales de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León se organizan como una gran metapoblación que presenta una variabilidad genética y una diversidad genotípica muy elevadas. La población está integrada esencialmente por aislados de tipo II. En su conjunto, la población presenta una uniformidad muy notable con un nivel de estructuración genética reducido, no observándose diferenciación genética entre poblaciones ni por D.O. (factor geográfico) ni por variedad de *vid* de origen. Se detecta una población minoritaria dentro de la población global, integrada por individuos de características particulares (incluye un buen número de aislados muy poco agresivos sobre judía), que presenta una diferenciación notable en relación con aquella y con la que muestra un flujo genético muy limitado. La población general, en consecuencia, no es absolutamente panmíctica. La diversidad genotípica observada es muy alta, lo que indica que existen muy numerosos y diferentes tipos genéticos, tipos que deben derivarse de procesos que generan nuevas variantes generación tras generación, fundamentalmente la recombinación característica de la reproducción sexual. Pero

se detecta desequilibrio de ligamiento, en niveles no muy elevados, pero significativos, lo que supone que en el campo se generan y multiplican asexualmente tipos clonales. Estos tipos, numerosos y diversos, se multiplican efectivamente de forma asexual, siendo posible detectar individuos diferentes con el mismo haplotipo, aunque sea con baja frecuencia, cuando se muestrea un número limitado de representantes de la población global en su conjunto, como hemos hecho en el estudio que se presenta en este trabajo. Ambos tipos de reproducción, por lo tanto, se están produciendo entre los aislados de campo de *B. cinerea* recogidos en los viñedos de Castilla y León.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo se resumen a continuación:

1. *B. cinerea* está presente en todas las zonas de viñedo analizadas en Castilla y León. Aunque la estrategia de muestreo introduce un sesgo en favor de los racimos infectados, los resultados derivados de nuestro estudio son indicativos de una elevada incidencia del patógeno en nuestros viñedos.
2. La caracterización de los perfiles genéticos de los aislados analizados en este trabajo demuestra que en nuestros viñedos son muy frecuentes las infecciones múltiples producidas por individuos de genotipos diferentes.
3. El análisis del carácter "agresividad sobre judía" de los aislados caracterizados y el establecimiento de clases fisiológicas en función de su capacidad de infección demuestran que el carácter "agresividad sobre judía" es un carácter cuantitativo, de variación continua, cuya expresión sigue una distribución de tipo normal en las poblaciones naturales del patógeno recogidas en los viñedos de Castilla y León y en cuya determinación participan varios genes. El grado de variación en la expresión del carácter en la población analizada es muy notable.
4. El carácter "capacidad de crecimiento saprofito sobre medios sintéticos" muestra igualmente una distribución de tipo normal en la población de aislados analizada, característica de los caracteres de variación continua determinados por varios genes. Existe variación también en relación con este carácter, pero el perfil de la curva de distribución del mismo indica que la población muestra un mayor grado de uniformidad en la expresión del carácter "capacidad de crecimiento saprofito" que en el caso del carácter "agresividad sobre judía".
5. Ambos caracteres, "agresividad sobre judía" y "crecimiento saprofito", muestran una correlación positiva moderadamente alta. Esto supone que una parte importante de la variación observada en la capacidad para infectar a los tejidos del huésped en los distintos aislados puede explicarse como una función de la variabilidad observada en la capacidad de crecimiento saprofito de los mismos. No obstante, ésta no debe ser la causa única a la que pueda atribuirse aquella variación. Deben existir otros factores que contribuyan a determinar el carácter "agresividad sobre judía" que no son exclusivamente factores relacionados con la capacidad de metabolizar sustratos nutritivos.
6. Los ensayos de infección llevados a cabo sobre judía, tomate y siete variedades de vid apoyan la naturaleza de patógeno generalista de *B. cinerea* y demuestran la existencia de una gran diversidad fisiológica en las poblaciones naturales del patógeno, en particular en la subpoblación de aislados analizados en este trabajo. El perfil de patogenicidad que dibuja el

conjunto de aislados seleccionados sobre cada huésped es diferente y específico, lo que sugiere que cada huésped presenta una configuración particular de factores que median en la susceptibilidad/resistencia del huésped al patógeno. Cabe destacar, no obstante, que el comportamiento de las tres variedades blancas, por un lado, es notablemente uniforme y que el comportamiento de las cuatro variedades tintas, por otro, también resulta notablemente uniforme.

7. Las variedades blancas de vid evaluadas en este trabajo muestran un grado de susceptibilidad al patógeno menor que las variedades tintas analizadas.
8. El análisis conjunto del comportamiento de todos los aislados analizados sobre todos los huéspedes considerados permite proponer que la población de aislados de *B. cinerea* que hemos caracterizado fisiológicamente en este trabajo está integrada mayoritariamente por aislados que pueden ser considerados como patógenos generalistas que pueden infectar los tres huéspedes considerados (y en el caso de la vid, las siete variedades utilizadas en nuestro estudio), aunque muestran diferencias en el grado en que causan la infección en cada huésped particular. En la población se identifican también, aunque en una proporción pequeña, aislados "no patógenos", incapaces de infectar ninguno de los huéspedes considerados, y aislados con comportamientos que permiten proponer cierto grado de adaptación a un huésped particular.
9. La población de aislados de *B. cinerea* recogidos de los viñedos de Castilla y León está integrada por aislados de tipo II, portadores de transposones.
10. La población en su conjunto es una población con una gran variabilidad genética y una diversidad genotípica muy elevada. Se identifican casi tantos haplotipos como individuos han sido analizados, como muestran los altos valores de Diversidad Genotípica detectada, indicativos de la ocurrencia de recombinación (y de reproducción sexual) en la población investigada. No obstante, en la misma se detecta la existencia de una pequeña fracción clonal. Este hecho, junto con la detección de desequilibrio de ligamiento tanto en la población global como en todas las subpoblaciones consideradas, demuestra que la reproducción asexual tiene lugar en el campo. Las evidencias obtenidas indican, por lo tanto, que ambos tipos de reproducción tienen lugar en las poblaciones naturales de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León.
11. La población de aislados de *B. cinerea* de los viñedos de Castilla y León muestra un nivel notable de uniformidad y no presenta una estructura genética evidente. Ninguno de los tres factores analizados, el geográfico, la variedad de vid de origen y el temporal, tiene un impacto importante a la hora de determinar una diferenciación entre poblaciones importante y, por lo tanto, una estructura genética de la población en su conjunto. No obstante, aunque no es notable, el mayor efecto detectado corresponde al factor geográfico derivado del establecimiento de D.O. Se ha comprobado que en este caso la mayor parte de la variación

total observada en las poblaciones tiene su origen en la variación dentro de las poblaciones (un 94,8%) y que un porcentaje menor (5,20%) de la variación tiene su origen en las diferencias entre poblaciones. Los análisis basados en el cálculo de los Coeficientes de Diferenciación apuntan en este mismo sentido, indicando que el factor geográfico impone una diferenciación reducida, pero no nula. A contrarrestar esta diferenciación puede contribuir la facilidad de multiplicación y de dispersión que tiene un hongo como *B. cinerea*. El alto valor de número de migrantes que se obtiene en nuestro análisis, y que implica un movimiento de individuos notable en la población, sugiere que esta es, en efecto, la situación real.

12. Se detecta una población minoritaria dentro de la población global, integrada por individuos de características particulares (incluye un buen número de aislados muy poco agresivos sobre judía), que presenta una diferenciación notable en relación con aquella y con la que muestra un flujo genético muy limitado. La población general, en consecuencia, no es absolutamente panmíctica.

APÉNDICES

APÉNDICE I

Aislados de *B. cinerea* presentes en cada clase fenotípica del ensayo de Infección en Judía.

Tabla Clases Fenotípicas Infección Judía		
	nº de aislados	
Clase 0	8	368, 369, 509, 530, 531, 572, 576, <i>B. aclada</i>
Clase I	4	371, 594, 65a, 230
Clase II	4	293, 446, 515, 571
Clase III	6	375, 400, 459, 544, 568, 149b
Clase IV	6	207, 425, 508, 529, 573, 188b
Clase V	15	276, 285, 330, 486, 513, 520, 524, 533, 540, 542, 583, 588, 592, 99a, 160c
Clase VI	23	211, 254, 277, 281, 283, 378, 461, 519, 525, 528, 532, 534, 535, 536, 538, 569, 585, 596, 615, 126c, 156b, 164b, 175a
Clase VII	35	257, 264, 287, 297, 363, 366, 367, 399, 412, 471, 477, 485, 492, 496, 511, 517, 522, 523, 526, 539, 541, 546, 550, 551, 553, 562, 595, 598, 7b, 25b, 27b, 116a, 148c, 198c, B0510
Clase VIII	55	217, 246, 253, 261, 266, 267, 269, 274, 275, 290, 310, 356, 380, 409, 413, 414, 440, 448, 469, 474, 482, 487, 488, 490, 499, 505, 521, 527, 543, 554, 581, 582, 584, 597, 599, 603, 620, 627, 633, 636, 639, 1a, 4a, 8b, 10b, 64a, 153a, 154c, 165a, 170c, 177a, 178c, UCA 156, UCA 206, T4
Clase IX	48	216, 250, 258, 362, 372, 376, 377, 381, 394, 397, 403, 431, 432, 435, 437, 454, 458, 460, 464, 472, 476, 478, 480, 483, 494, 497, 502, 504, 580, 604, 611, 612, 626, 628, 635, 637, 638, 644, 22b, 28b, 30a, 33c, 52a, 59c, 131a, 166c, 180c, UCA 001
Clase X	51	209, 222, 224, 228, 247, 248, 249, 288, 292, 296, 300, 315, 316, 317, 322, 325, 326, 327, 329, 407, 417, 423, 426, 430, 443, 473, 479, 481, 489, 495, 503, 555, 570, 574, 589, 602, 610, 613, 616, 618, 621, 625, 629, 631, 632, 641, 26a, 37b, 138b, Bd90, 251
Clase XI	37	202, 223, 227, 232, 260, 263, 265, 298, 299, 301, 352, 354, 355, 418, 428, 429, 434, 465, 475, 484, 493, 501, 548, 549, 552, 561, 577, 578, 640, 642, 645, 646, 9c, 48b, 103a, 151b, 199c
Clase XII	13	212, 229, 233, 235, 309, 312, 351, 506, 507, 547, 617, 624, 634
Clase XIII	6	206, 231, 328, 563, 623, 647
Clase XIV	5	304, 305, 307, 444, 545

APÉNDICE II

Aislados de *B. cinerea* presentes en cada clase fenotípica del ensayo de Crecimiento Saprofítico.

Tabla Clases Fenotípicas Crecimiento Saprofítico		
	n° aislados	
Clase I	5	368, 369, 530, 531, 571
Clase II	1	293
Clase III	2	508, 65a
Clase IV	2	230, 594
Clase V	1	572
Clase VI	1	149b
Clase VII	2	116a, B0510
Clase VIII	3	544, 615, B. aclada
Clase IX	11	224, 227, 460, 509, 526, 529, 597, 599, 156b, 164b, 188b
Clase X	38	202, 206, 212, 231, 232, 233, 235, 257, 285, 287, 297, 367, 414, 469, 492, 511, 519, 521, 523, 524, 528, 546, 569, 576, 588, 612, 613, 628, 631, 638, 4a, 8b, 22b, 27b, 33c, 126c, 148c, 170c
Clase XI	103	209, 211, 222, 223, 228, 229, 249, 254, 258, 261, 265, 266, 267, 269, 277, 281, 288, 290, 296, 298, 300, 326, 327, 329, 362, 366, 371, 376, 378, 400, 413, 425, 426, 432, 435, 461, 465, 471, 472, 473, 474, 477, 479, 480, 483, 485, 486, 487, 496, 504, 505, 506, 513, 515, 517, 520, 522, 525, 527, 532, 533, 535, 538, 540, 541, 580, 582, 583, 584, 585, 589, 596, 598, 603, 604, 610, 616, 617, 623, 625, 634, 637, 641, 645, 646, 1a, 7b, 10b, 25b, 30a, 37b, 99a, 103a, 131a, 138b, 151b, 153a, 154c, 165a, 166c, 175a, 180c, 199c
Clase XII	113	207, 216, 217, 246, 247, 248, 250, 251, 253, 260, 263, 264, 274, 275, 276, 292, 299, 301, 310, 328, 330, 351, 352, 356, 363, 372, 375, 377, 380, 381, 394, 397, 399, 403, 407, 409, 412, 417, 418, 423, 430, 431, 437, 440, 444, 446, 448, 454, 458, 459, 464, 475, 476, 478, 481, 482, 484, 488, 489, 490, 493, 494, 495, 497, 499, 501, 502, 503, 507, 534, 536, 539, 542, 543, 547, 549, 550, 551, 554, 568, 570, 574, 578, 581, 595, 602, 620, 621, 624, 626, 629, 632, 633, 635, 636, 639, 640, 642, 644, 647, 9c, 26a, 28b, 48b, 52a, 59c, 64a, 160c, 177a, 178c, 198c, UCA001, UCA156
Clase XIII	25	283, 305, 309, 312, 315, 316, 317, 322, 325, 354, 355, 429, 434, 443, 545, 552, 553, 555, 562, 573, 577, 611, 618, 627, Bd90
Clase XIV	9	304, 307, 428, 548, 561, 563, 592, UCA 206, T4

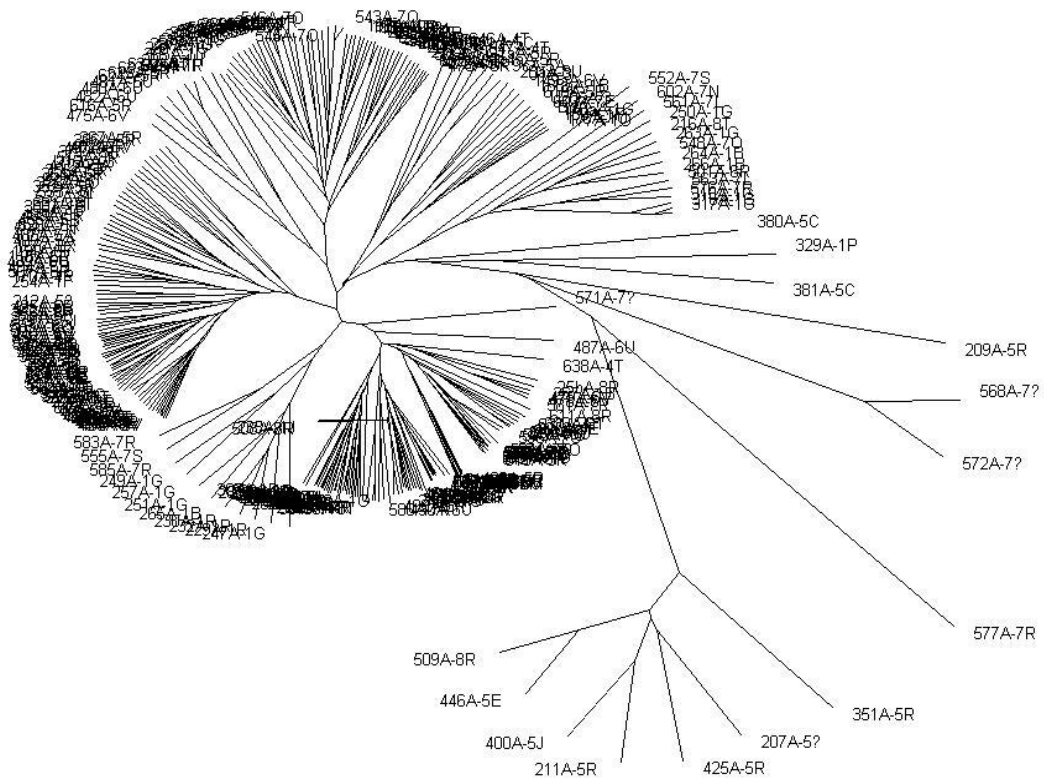
APÉNDICE III

Aislados de *B. cinerea* subdivididos según la presencia de los transposones: *Flipper*, *Boty* y *Flipper*, y *Boty*.

Tabla Clases de Transposones		
Transposón	Nº de aislados	
Flipper	2	568, 178c
Boty+Flipper	95	217, 222, 233, 253, 254, 266, 267, 283, 285, 290, 292, 293, 296, 297, 298, 299, 300, 309, 325, 330, 351, 352, 354, 355, 356, 362, 369, 372, 376, 378, 380, 381, 400, 407, 412, 428, 429, 430, 431, 448, 469, 471, 472, 473, 474, 476, 477, 478, 480, 484, 489, 503, 509, 511, 515, 523, 524, 533, 552, 553, 554, 562, 570, 580, 581, 585, 596, 597, 598, 602, 603, 611, 631, 632, 641, 642, 8b, 9c, 30a, 33c, 37b, 126c, 154c, 156b, 160c, 164b, 165a, 166c, 170c, 175a, 177a, 180c, 188b, 199c, B0510
Boty	189	202, 206, 207, 209, 211, 212, 216, 223, 224, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 235, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 257, 258, 260, 261, 263, 264, 265, 269, 274, 275, 276, 277, 281, 287, 288, 301, 304, 305, 307, 310, 312, 315, 316, 317, 322, 326, 327, 328, 329, 366, 367, 371, 397, 409, 425, 426, 432, 434, 435, 437, 440, 443, 444, 446, 454, 458, 459, 460, 461, 464, 465, 475, 479, 481, 482, 483, 485, 486, 487, 488, 490, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 499, 501, 502, 504, 505, 506, 507, 508, 513, 517, 519, 520, 521, 522, 525, 526, 527, 528, 532, 534, 535, 536, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 555, 561, 563, 569, 571, 572, 573, 574, 576, 577, 578, 582, 583, 584, 588, 589, 592, 594, 595, 612, 613, 615, 616, 617, 618, 620, 624, 625, 629, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 644, 645, 646, 647 1a, 4a, 7b, 10b, 22b, 25b, 26a, 27b, 28b, 48b, 52a, 59c, 64a, 65a, 99a, 103a, 116a, 131a, 148b, 149b, 151b, 153a, 198c

APÉNDICE IV

Dendrograma de la Figura 33 representado sin raíz (unrooted tree).



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agapow, P. M. and Burt, A.** (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1, 101–102.
- Ajouz, S., Decognet, V., Nicot, P. C., Bardin, M.** (2010). Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal Biol.* 114(11-12), 949-954.
- Akins, R. A.** (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 43, 285–318.
- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. and Leroux, P.** (2002). Eburicol 14 α -demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 106: 1171-1178.
- Albertini, C. and Leroux, P.** (2004). A *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene (ERG27) that is homologous to the mammalian 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7). *European Journal of Plant Pathology* 110: 723-733.
- Alfonso, C., Raposo, R. and Melgarejo, P.** (2000). Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49, 243–251.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J.-M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M.-H., Dickman, M.** (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7 (8).
- Anderson, J. P.** (1924). *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology* 14, 152-155.
- Applied Biosystems.** (2007). AFLP Plant Mapping Protocol.
(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_040959.pdf)

- Arrigo, N., Tuszyński, J. W., Ehrich, D., Gerdes, T. and Alvarez, N.** (2009). Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *BMC Bioinformatics* 10 (33), 1-14.
- Arroyo, R. G., Martínez, J. M. Z., García, B. C. and Zabalgoitia, I.** (2002) Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichloë festucae* in semiarid grasslands. *Mol Ecol.* 2002 Mar;11(3):355-64.
- Atallah, Z. K., Maruthachalam, K., du Toit, L., Koike, S. T., Davis, R. M., Klosterman, S. J., Hayes, R. J. and Subbarao, K. V.** (2010). Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 47, 416–422.
- Baaren, P., Legendre, L. and Kan, J. A. L.** (2004). Plant defence compounds against *botrytis* infection. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Eds. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzyński and N. Delen (Kluwer Academic Publishers: Netherlands) pp. 143–161.
- Backhouse, D. and Willetts, H. J.** (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Can. J. Microbiol.* 30, 171–178.
- Bardin, M., Fargues, J., Couston, L., Troulet, C., Philippe, G. and Nicot, P. C.** (2004). Combined biological control against three bioaggressors of tomato. *La Revue Technique des Pepinieristes Horticulteurs Maraichers* 461, 36–39.
- Bardin, M., Fargues, J. and Nicot, P. C.** (2008) Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control* 46, 476–483.
- Becker, J. O. and Schwinn, F. J.** (1993). Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi – Status and outlook. *Pesticide Science* 37, 355–363.
- Beever, R. E. and Parkes, S. L.** (1993). Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 21, 303–10.
- Beever, R. E. and Parkes, S. L.** (2003). Use of nitrate non-utilising (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *European Journal of Plant Pathology* 109, 607-613.
- Beever, R. E. and Weeds, P. L.** (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzyński, P. and Delen, N., eds), pp. 29–52.
- Beismann, H., Barker, J. H. A., Karp, A. and Speck, T.** (1997). AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Mol. Ecol.* 6: 989–993.

- Benito, E. P., ten Have, A., van't Klooster, J. W. and van Kan, J. A. L.** (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European journal of plant pathology* 104, 207-220.
- Bentley, A. R., Leslie, J. F., Liew, E. C. Y., Burgess, L. W., and Summerell, B. A.** (2008). Genetic structure of *Fusarium pseudograminearum* populations from the Australian grain belt. *Phytopathology* 98:250-255.
- Bentley, A. R., Milgroom, M. G., Leslie, J. F., Summerell B. A. and Burgess L. W.** (2009). Spatial aggregation in *Fusarium pseudograminearum* populations from the Australian grain belt. *Plant Pathology* 58, 23–32.
- Berrie, A. M., Harris, D. C., Xu, X. –M., and Burgess, C. M.** (2000). A potencial system for managing *Botrytis* and powdery mildew in main season strawberries. *Acta Horticulturae* 567, pp. 647-649.
- Biessmann, H., Valgeirsdottir, K., Lofsky, A., Chin, C., Ginther, B., Levis, R. W. and Pardue, M. L.** (1992). *HeT-A*, a transposable element specifically involved in “healing” broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 12, pp. 3910-3918.
- Blakeman, J. P.** (1993). Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology* 42, 479–493.
- Boeke, J. D.** (1989). Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 335–374. In *Mobile DNA*, edited by D.E. Berg and M.M. Howe. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P. B., Pompanon, F., Brochmann, C. and Taberlet, P.** (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13, 3261–3273
- Bonin, A., Pompanon, F. and Taberlet, P.** (2005). Use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers in Surveys of Vertebrate Diversity. *Methods in Enzymology*, vol. 395, 145-161.
- Bonin, A., Ehrich, D. and Manel, S.** (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16, 3737–3758.
- Broome, J. C., English, J. T., Marois, J. J., Latorre, B. A. and Avilés, J. C.** (1995). Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. *Phytopathology* 85, 97-102.
- Brown, A. H. D., Feldman, M. W., and Nevo, E.** (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96, 523–536.
- Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W.** (1991). Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22: 525-564.

- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B. and Tudzynski, P.** (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25, 445-450.
- Caballero, A., Quesada, H. and Rolán-Alvarez, E.** (2008). Impact of amplified fragment length polymorphism size homoplasmy on the estimation of population genetic diversity and the detection of selective *loci*. *Genetics* 179, 539–554.
- Callinan, P. A. and Batzer, M. A.** (2006). Retrotransposable elements and human disease. *Genome Dyn. Basel, Karger*, vol. 1, 104–115.
- Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S., Benavente, J. and Castillo, A.** (1999). A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 175, 95-99.
- Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S. and Castillo, A.** (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 228, pp. 87-91.
- Chen, X., Gao, Y., Zhao, N., Zhao, T. and Zhu, M.** (2009). An AFLP analysis of genetic diversity and structure of *Caragana microphylla* populations in Inner Mongolia steppe, China. *Biochemical Systematics and Ecology* 37, 395–401.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A. and Viaud, M.** (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 277, 1–10.
- Chun, S. J. and Lee, Y. H.** (1997). Inheritance of dsRNA in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* 148, 159-162.
- Coenen, A., Kevei, F. and Hoekstra, R.** (1997). Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research (Cambridge)* 69, 1-10.
- Cole, L., Dewey, F. M., and Hawes, C. R.** (1996). Infection mechanisms of *Botrytis species*: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100, 277-286.
- Covert, S. F.** (1998). Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* 33, 311-319.
- Coulomb, C., Lizzi, Y., Coulomb, P. J., Roggero, J. P., Coulomb, P. O. and Agullon, O.** (1998) Can copper be an elicitor? *Phytoma* 512, 41–46.
- Daboussi, M. J.** (1997). Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica* 100, 253–260.

- Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B. and Dubourdieu, D.** (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis* 40, 93–99.
- Dawe, A. L. and Nuss, D. L.** (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35, 1-29.
- Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y. and Nicot, P. C.** (2009). Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *The American Phytopathological Society, Ecology and Epidemiology* 99 (2), 185-193.
- Delcán, J. and Melgarejo, P.** (2002). Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botryotinia fuckeliana*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 391–400.
- Dell, K. J., Gubler, W. D., Krueger, R., Sanger, M. and Bettiga, L. J.** (1998). The efficacy of JMS Stylet-Oil on grape powdery mildew and botrytis bunch rot and effects on fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 11–16.
- Derckel, J.-P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B. and Legendre, L.** (1999). Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *The American Phytopathological Society* 89 (3), p. 197 – 203.
- Dice, L. R.** (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, 297–302.
- Díez, R. M.** (2004). Mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*: El papel de las formas activas de oxígeno. Tesina.
- Dik, A. J. and Wubben, J. P.** (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer, Dordrecht.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., Brygoo, Y.** (1995). *Boty*, a Long-Terminal-Repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, p. 103–108.
- Dobinson, K. F. and Hamer J. E.** (1993). The ebb and flow of a fungal genome. *Trends in Microbiol.* 1, 348–352.
- Doolittle, W. F. and Sapienza, C.** (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284, pp. 644-646.
- Doss, R. P., Deisenhofer, J., Krug von Nidda, H.–A., Soeldner, A. H. and McGuire, R. P.** (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.

- Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E. and Pommer, E.H.** (1989) New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Pers. Neth J Plant Pathol* 95: 53-62.
- Edwards, S. G. and Seddon, B.** (1992). *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage. 10th International Botrytis Symp: Recent Advances in *Botrytis* Research (Pudoc: Wageningen, Netherlands) pp. 267–271.
- Eilenberg, J., Hajek, A. and Lomer, C.** (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46, 387–400.
- Elad, Y. and Shtienberg, D.** (1994). Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection* 13, 109–114.
- Elad, Y.** (1995). Mycoparasitism. In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular basis, Vol 2: Eukaryotes. Eds. K. Kohmoto, U.S. Singh and R.S. Singh (Elsevier Science Ltd: Oxford, UK) pp. 289–307.
- Elad, Y.** (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102, 719–732.
- Elad, Y.** (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19, 709–714.
- Elad, Y and Stewart, A.** (2004). Microbial control of *Botrytis* spp. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 223-241.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.** (2004). *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 1 – 6.
- Elmer, P. A. G. and Michailides, T. J.** (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Eds. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (Kluwer Academic Publishers: Netherlands) pp. 243–272.
- Elmer, P. A. G. and Reglinski, T.** (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 55, 155–177.
- Epton, H. A. S. and Richmond, D. V.** (1980). Formation, structure and germination of conidia. In “*The Biology of Botrytis*” (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds), pp. 41-83. Academic Press, London.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J.** (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, p. 2611-2620.
- Everett, K. R., Vanneste, J. L., Hallett, I. C. and Walter, M.** (2005). Ecological alternatives for disease management of fruit rot pathogens. *New Zealand Plant Protection* 58, 55–61.

- Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J.** (1992). Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S.** (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 47-50.
- Faretra, F. and Antonacci, E.** (1987). Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 26: 29-35.
- Faretra, F., Antonacci, E. and Pollastro, S.** (1988). Sexual-behavior and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 134, 2543-2550.
- Faretra, F. and Pollastro, S.** (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 8, 943-951. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 29-52.
- Faretra, F. and Grindle, M.** (1992) Genetic studies of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). In: *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B., eds), pp. 7–17. Wageningen, The Netherlands: Pudoc Scientific Publishers.
- Faretra, F. and Pollastro, S.** (1996). Genetic studies of the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) by analysis of ordered tetrads. *Mycological Research* 100, 620-624.
- Faretra, F., Pollastro, S., Santomauro, A. and Miazzi, M.** (1996). Genetics of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*): an overview. In: *Programme and Book of Abstracts of the XI International Botrytis Symposium*. Wageningen, The Netherlands, p.11.
- Farquhar, S.A., Goff, N.M., Shadbeh, N., Samples, J., Ventura, S., Sanchez, V., Rao, P. and Davis, S.** (2009). Occupational health and safety status of indigenous and Latino farm workers in Oregon. *Journal of Agricultural Safety and Health* 15, 89–102.
- Fernández, L.** (2009). España, El mayor viñedo del mundo. *Pocket Vinos de España* (Ediciones Mundo Natura) 1, pp. 8-9.
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C. and Debieu, D.** (2008). Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 52(11), p. 3933–3940.

- Finkers, R., van Heusden, A.W., Meijer-Dekens, F., van Kan, J.A., Maris, P., y Lindhout, P.** (2007a). The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. Theor. Appl. Genet. 114:1071-80.
- Finkers, R., van den Berg, P., van Berloo, R., ten Have, A., van Heusden, A. W., van Kan, J. A. L. and Lindhout, P.** (2007b). Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. Theor Appl Genet 114, pp. 585–593.
- Fokkema, N.J.** (1993). Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. Pesticide Science 37, 411–416.
- Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J. M. and Brygoo, Y.** (2002). Characterization of nine polymorphic microsatellite *loci* in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). Mol. Ecol. Notes 2, 253–255.
- Fournier, E, Levis, C, Fortini, D, Leroux, P, Giraud, T and Brygoo, Y.** (2003). Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. Mycologia 95(2), 251-261.
- Fournier, E., Giraud, T. and Brygoo, Y.** (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. Mycologia 97: 1251–1267.
- Fournier, E. and Giraud, T.** (2008). Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. J. Evol. Biol. 21, 122-132.
- GeneMapper Software version 4.0.** Reference and Troubleshooting Guide. Applied Biosystems.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. y Brygoo, Y.** (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. Mol. Biol. Evol. 14(11), 1177-1185.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C. and Brygoo, Y.** (1998). The minisatellite MSB1, in the fungus *Botrytis cinerea*, probably mutates by slippage. Mol. Biol. Evol. 15(11), 1524–1531.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. and Brygoo, Y.** (1999). Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. Phytopathology vol. 89 (10), 967-973.
- González, M., Rodríguez, R., Zavala, M. E., Jacobo, J. L., Hernández, F., Acosta, J., Martínez, O. and Simpson, J.** (1998). Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathology, 88: 292–299.

- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M. H., and Levis, C.** (2004). The tetraspanin Bc-Pls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* 51, 619-629.
- Griffiths, A. J. F.** (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews* 59, 673-685.
- Griffiths, R. and Orr, K.** (1999). The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Mol. Ecol.* 8, 671–674.
- Grindle, M.** (1979). Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 111, 109–20.
- Guimarães, R. L., Chetelat, R. T. and Stotz, H. U.** (2004). Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids and involves induced hyphal death. *European Journal of Plant Pathology* 110: 13-24.
- Gurr, G. M., Wratten, S. D. and Barbosa, P.** (2000). Success in conservation biological control of arthropods. In: *Biological Control: Measures of Success*. Eds. G.M. Gurr and S.D. Wratten (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands) pp.105–132.
- Hansen, H. N.** (1938). The dual phenomenon in imperfect fungi. *Mycologia* 30, 442-455. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 29-52.
- Harman, G. E., Latorre B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D. G., Nielsen, P. A., Tronsmo, A. and Pearson, R. C.** (1996). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7: 259-266.
- Haubold, B., Travisano, M., Rainey, P. B. and Hudson, R. R.** (1998). Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. *Genetics*, 150: 1341–1348.
- Hawkesworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., and Pegler, D.N.** (1995). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. International Mycological Institute, Surrey, England.
- Hiratsuka, K., Namba, S., Yamashita, S. and Doi, Y.** (1987). Linear plasmid-like DNA's in the fungus *Botrytis cinerea*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 53, 638-642. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 29-52.
- Holland, B. R., Clarke, A. C. and Meudt, H. M.** (2008). Optimizing Automated AFLP Scoring Parameters to Improve Phylogenetic Resolution. *Syst. Biol.* 57(3), 347–366.
- Holsinger, K. E. and Weir, B. S.** (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{st} . *Nature Reviews Genetics* 10, p. 639-650.
- Howell, G. S.** (2001). Sustainable grape productivity and the growth–yield relationship: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 165–174.
- Howell, C. R.** (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87, 4–10.

- Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N. and Forster R. L. S.** (1995). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. Mycological Research 99, 1472-1478. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 29-52.
- Howitt, R. L. J.** (1998). Characterisation of mycoviruses in the plant pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. PhD thesis, University of Auckland, New Zealand.
- Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N. and Forster R. L. S.** (2001). Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’ viruses. Journal of General Virology 82, 67-78.
- Ingram, D. M. and Meister, C. W.** (2006). Managing *Botrytis* gray mold in greenhouse tomatoes using traditional and biofungicides. Plant Health Progress July, 1–5.
- Isenegger, D. A., Macleod, W. J., Ford, R. and Taylor, P. W. J.** (2008a). Genotypic diversity and migration of clonal lineages of *Botrytis cinerea* from chickpea fields of Bangladesh inferred by microsatellite markers. Plant Pathology 57, 967-973.
- Isenegger, D. A., Ades, P. K., Ford, R. and Taylor P. W. J.** (2008b). Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. Fungal Diversity 29: 17-26.
- Jackson, R.S.** (1994). Specific and distinctive wine styles: Sweet table wines. In: Wine science: Principles and applications. Eds. S.L. Taylor (Academic Press: San Diego) pp. 434–440.
- Jackson, R.S.** (2008a). Vineyard practice: Disease, pest and weed control. In: Wine Science: Principles and Applications. (Academic Press: London) pp. 175–212.
- Jackson, R.S.** (2008b). Vineyard practice: Fertilization. In: Wine Science: Principles and Applications. (Academic Press: London) pp. 160–174.
- Jacometti, M.A., Wratten, S.D. and Walter, M.** (2007) Understorey management increases grape quality, yield and resistance to *Botrytis cinerea*. Agriculture, Ecosystems and Environment 122, 349–356.
- Jacometti, M. A., Wratten, S. D. and Walter, M.** (2010). Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Journal of Grape and Wine Research 16, 154–172.
- Jarvis, W. R.** (1962). The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. in a raspberry plantation. Transactions of the British Mycological Society 45, 549-559.
- Jarvis, W. R.** (1977). In: “*Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. A guide to the literature” Canada Department of Agriculture (Research Branch), Ottawa (Canada).

- Jeandet, P., Adrian, M., Joubert, J.M., Hubert, F. and Bessis, R.** (1996). Stimulating the natural defences of grape. A complement to phytosanitary control of *Botrytis*. *Phytoma* 488, 21–25.
- Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A.C., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A. and Harmon, R.** (2000). Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: Application to the control of grey mould in the vineyard. *Acta Horticulturae* 528, 591–596.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C. , Bessis, R., Debord, S. , Sbaghi, M., and Adrian, M.** (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (10), pp 2731–2741.
- Johnson, K. B. and Powelson, M. L.** (1983). Analysis of spore dispersal gradients of *Botrytis cinerea* and gray mold disease gradients in snap beans. *Phytopathology* 73, 741-746.
- Johnson, K.B.** (1994). Dose-response relationships and inundative biological-control. *Phytopathology* 84, 780–784.
- Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A. and Fournier, E.** (2008). Geography, Plants, and Growing Systems Shape the Genetic Structure of Tunisian *Botrytis cinerea* Populations. , *Phytopathology* vol. 98 (12), 1271-1279.
- Katan, T., Elad, Y. and Yunis, H.** (1989). Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 38, 86-92.
- Kerssies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M. and van Kan, J. A. L.** (1997). Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* 81 (7), 781-786.
- Kidwell, M. G. and Lisch, D.** (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, pp. 7704-7711.
- Kliebenstein, D. J., Rowe, H. C. and Denby, K. J.** (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* 44 (1), pp. 25-36.
- Koller, W.** (1992). Antifungal agents with target site in sterol functions and biosynthesis. *In* W. Koller (ed.), *Target sites of fungicide action*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 119–206.
- Korolev, N., David, D. R. and Elad, Y.** (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl* 53, 667–683.
- Larousse do Vinho.** (2004). Espanha, Larousse do Brasil, pp. 18-20; 212-232.

- Latorre, B., Flores, V., Sara, A. M. and Roco, A.** (1994). Dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. *Plant Disease* 7: 990-994.
- Leone, G.** (1990). In vivo and in vitro phosphate dependent polygalacturonase production by different isolates of *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 94:1039-1045.
- Leroux, P.** (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Eds. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands) pp. 195–222.
- Leung, H., Nelson, R. J. and Leach, J. E.** (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10:157-205.
- Levis, C., Fortini, D. and Brygoo, Y.** (1997). *Flipper*, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol Gen Genet* 254, 674-680
- Liljander, A., Wiklund, L., Falk, N., Kweku, M., Mårtensson, A., Felger, I. and Färnert, A.** (2009) Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (*msp1* and 2). *Malaria Journal* 2009, 8 (78), p. 1-14.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F. and Bellincampi, D.** (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 143 (4), pp. 1871-1880.
- Lorenz, D. H.** (1983). Analysis of morphological variation and pathogenesis in *Botrytis cinerea* Pers. & *Botryotinia fuckeliana* Whetz. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 90, 622–33 [in German].
- Lorenz, D. H. and Eichorn, K. W.** (1983). Investigations on *Botryotinia fuckeliana* Whetz., the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 9, 1-11.
- Lynch, M. and Crease, T. J.** (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol Biol Evol* 7 (4), pp. 377-394.
- Lynch, M. and Milligan B. G.** (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol.* 3(2), 91-99.
- Ma, Z. and Michailides, T. J.** (2005). Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease* 89, 1083-1089.
- Manonmani, K., Jayasekhar, M., Justin, C.G.L. and Thangaselvabai, T.** (2007) Induced systemic resistance (ISR) in plant disease management – A review. *Agricultural Reviews* 28, 42–48.

- Mariette, S., Le Corre, V., Austerlitz, F. and Kremer, A.** (2002). Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology*, 11, 1145–1156.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. and Spratt, B. G.** (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, pp. 4384–4388.
- McClintock, B.** (1947). Cytogenetic studies of maize and *Neurospora*. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 46, 146–152.
- McClintock, B.** (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16, 13–47.
- Melgarejo, P., Raposo, R., Moyano, C. y Gomez, V.** (2002). Control integrado de *Botrytis cinerea* en cultivos hortícolas de invernadero. *Phytoma España* 135, p. 125-127.
- Meudt, H. M. and Clarke, A. C.** (2007). Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science* Vol.12 No.3.
- Miceli, A., Ippolito, A., Linsalata, V. and Nigro, F.** (1999) Effect of preharvest calcium treatments on decay and biochemical changes in table grape during storage. *Phytopathologia Mediterranea* 38, 47–53.
- Milgroom, M.** (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34, 457–77.
- Miller, L. M.** (2000). Classifying genealogical origins in hybrid populations using dominant markers. *J. Hered.* 91: 46–49.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M. and Safaie, N.** (2008). Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *J. Phytopathology* 156, 21–28.
- Mish, F. C. (Editor-in-Chief).** (1996). *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th Edition). MA: Merriam- Webster, Inc.
- Mohavedi, S. and Heale, J.B.** (1990). The roles of aspartic proteinase and endopeptin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36, 303–24.
- Moore, J. K. and Haber, J. E.** (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* 383, p. 644-646.
- Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R. and Melgarejo, P.** (2003). Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *European Journal of Plant Pathology* 109: 515–522.

- Mundy, D. C.** (2008). A review of the direct and indirect effects of nitrogen on *Botrytis* bunch rot in wine grapes. *New Zealand Plant Protection* 61, pp. 306–310.
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. and Giraud, T.** (2002). Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycol.Res.* 106:594-601.
- Muñoz, C., Talquenca, S. G., Oriolani, E. and Combina, M.** (2010). Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina. *Rev. Iberoam Micol.* p. 1-5.
- Nei, M.** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70, 3321–3323.
- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.
- Nelson, M. E. and Powelson, M. L.** (1988). Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Disease* 72, 727–729.
- Nybohm, H.** (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143–1155
- Oliver, R. P.** (1992). Transposons in filamentous fungi, pp. 3–11. In *Molecular Biology of filamentous fungi*, edited by U. Stahl and P. Tudzynski. *Proceedings of the EMBO-Workshop, Berlin 1991, VCH.*
- Pappas, A. C.** (1997). Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* 16, 257–263.
- Parat, C., Chaussod, R., Leveque, J., Dousset, S. and Andreux, F.** (2002). The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *European Journal of Soil Science* 53, 663–669.
- Parry, K. E. and Wood, R. K. S.** (1958). The adaptation of fungi to fungicides: Adaptation to copper and mercury salts. *Annals of Applied Biology* 46, 446–456.
- Plotto, A., Roberts, D. D. and Roberts, R. G.** (2003). Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Horticulturae* 628, 737–745.
- Pollastro, S., Faretra, F., Canio, V. and De Guido, A.** (1996). Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* 102, 607-613. In “*Botrytis: Biology, Pathology and Control*”, pp. 29-52.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. and Taberlet, P.** (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature* vol 6, p. 847-859.

- Pritchard, J. K., Stephens M. and Donnelly P.** (2000a). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Quidde, T., Büttner, P. and Tudzynski, P.** (1999). Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *European Journal of Plant Pathology* 105, 273-283.
- Rajaguru, B. A. P. and Shaw, M. W.** (2010). Genetic differentiation between hosts and locations in populations of latent *Botrytis cinerea* in southern England. *Plant Pathology*, p. 1-10.
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V. and Melgarejo, P.** (1996). Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45, 497-505.
- Rathore, H. S. and Khan, A. A.** (2000). Fungicide and herbicide residue in water. In: *Handbook of water analysis*. Eds. L. Nolle (CRC Press: New York, USA) pp. 609–655.
- Rebollo, R., Horard, B., Hubert, B. and Vieira C.** (2010). Jumping genes and epigenetics: Towards new species. *Gene* 454, pp.1–7.
- Rebordinos, L., Vallejo, I., Santos, M., Collado, I. G., Carbú, M. y Cantoral, J. M.** (2000). Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol* 17, S37-S42.
- Redl, H. and Bauer, K.** (1990). Prüfung alternativer Mittel auf deren Wirkung gegenüber *Plasmopara viticola* und deren Einfluß auf das Ertagsgeschehen unter österreichischen Weinbaubedingungen. *Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein* 40, 134–138.
- Reglinski, T., Poole, P. R., Whitaker, G. and Hoyte, S. M.** (1997). Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. *Plant Pathology* 46, 716–721.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G. and Boccara, M.** (1994). Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology* 140, 3249-3255.
- Reino, J. L., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R. and Collado, I. G.** (2004). Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 152:563–566.
- Reuveni, R., Raviv, M. and Bar, R.** (1989). Sporulation of *Botrytis cinerea* as affected by photoselective sheets and filters. *Annals of Applied Biology* 115, pp. 417-424.
- Reuveni, R. and Raviv, M.** (1992). The effect of spectrally modified polyethylene films on the development of *Botrytis cinerea* in greenhouse grown tomato plants. *Biological Agriculture and Horticulture* 9, pp. 77-86.

- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., Viret, O.** (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. FEMS Microbiology Letters 209, 169 – 174.
- Rinehart, T. A.** (2004). AFLP analysis using GeneMapper® software and an Excel® macro that aligns and converts output to binary. Bio Techniques 37.
- Rohlf, J. F.** (2002). NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Mutivariate Analysis System Version 2.11W. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- Rosendahl, S. and Taylor, J. W.** (1997). Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. Mol. Ecol. 6: 821–829.
- Rosewich, U. L. and Kistler, H. C.** (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. Annual Review of Phytopathology 38, 325-363. In “*Botrytis*: Biology, Pathology and Control”, pp. 29-52.
- Rosslenbroich, H. -J.** (1999). Efficacy of fenhexamid (KBR 2738) against *Botrytis cinerea* and related fungal pathogens. Pflanzenschutz-Nachr. 52, 127–144.
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levensont, C. H. and Erlich, H. A.** (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6230-6234.
- Schilder, A. M. C., Gillett, J. M., Sysak, R. W. and Wise, J. C.** (2002). Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture (Foko: Weinsberg, Germany) pp. 163–167.
- Schlüter, P. M. and Harris, S. A.** (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Mol. Ecol. Notes 6, pp. 569-572.
- Schmale III, D. G., Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J. and Bergstrom, G. C.** (2006). Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. Phytopathology 96 (9), pp. 1021-1026.
- Schmitt, A., Kunz, S., Nandi, S., Seddon, B. and Ernst, A.** (2002). Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries. Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit- Growing and Viticulture (Foko: Weinsberg, Germany) pp. 146–151.
- Shirane, N., Masuko, M. and Hayashi, Y.** (1988) Nuclear behaviour and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 78, 1627–1630.
- Slotkin, R. K. and Martienssen, R.** (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nature Genetics, vol. 8, 272-285.

- Sokal, R. R. and Michener, C. D.** (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409–1438.
- Staats, M., von Baarlen, P. and van Kan, J.A.L.** (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22 (2): 333 – 346.
- Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J. A. L.** (2007). AFLP analysis of genetic diversity in populations of *Botrytis elliptica* and *Botrytis tulipae* from the Netherlands. *Eur J Plant Pathol* 117, 219–235.
- Summers, R. W., Heaney, S. P. and Grindle, M.** (1984). Studies of a dicarboximide resistant heterokaryon of *Botrytis cinerea*. *British Crop Protection Conference: Pests and Disease* 2, 453-458.
- Tanovic, B., Delibasic, G., Milivojevic, J. and Nikolic, M.** (2009). Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 61 (3), p. 419-429.
- Tello, M. L.** (2006). Purificación, identificación y estimación de la patogenicidad de una colección de aislados de campo de *Botrytis cinerea* recogidas en viñedos de las Arribes del Duero. Proyecto Fin de Carrera.
- Tello, M. L., Arranz, M., Benito-Pescador, D., Gómez, J. L. T., Molina, R., Benavides, P. G., Eslava, A. P. and Benito, E. P.** (2007). Cepas de *Botrytis cinerea* causantes de podredumbre gris en viñedos de las Arribes del Duero. *Innovación y Tecnología Agroalimentaria*, nº 2.
- ten Have, A., van Berloo, R., Lindhout, P., van Kan, J. A. L.** (2007). Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato. *Eur J Plant Pathol* 117, pp. 153-166.
- Tenberge, K. B.** (2004). Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In "*Botrytis: Biology, Pathology and Control*" (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds.), pp. 67-84. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Teng, S. C., Kim, B. and Gabriel, A.** (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal break. *Nature* 383, p. 641-644.
- This, P., Lacombe, T. and Thomas, M. R.** (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22(9), 511-519.
- Thompson, J. R. and Latorre, B. A.** (1999). Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease*, vol. 83 (12), 1090 – 1094.
- Trigiano, R. N., Windham, M. T. y Windham, A. S.** (2010). *Fitopatología. Conceitos e Exercícios de Laboratório*. 2ª ed. Artmed Editora S. A.

- Tudzynski, P. and Kokkelink, L.** (2009). *Botrytis cinerea*: molecular aspects of a necrotrophic life style. In: Deising, H. B., editor. Plant Relationships. V. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 29-50.
- Typas, M., Mavridou, A. and Kramer, K.** (1998). Mitochondrial DNA differences provide maximum intraspecific polymorphism in the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*, and allow isolate detection/identification. In: Bridge P, Couteaudier Y and Clarkson J (eds) Molecular Variability of Fungal Pathogens. (pp. 227-238) CAB International, Wallingford, UK. In “*Botrytis*: Biology, Pathology and Control”, pp. 29-52.
- User Reference Guide.** ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer. Applied Biosystems.
- Váczy, K. Z., Sándor, E., Karaffa, L., Fekete, E., Fekete, E., Árnyasi, M., Czeglédi, L., Kövics, G. J., Druzhinina, I. S. and Kubicek, C. P.** (2008). Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. Phytopathology, vol. 98 (12), 1312 – 1319.
- Vallejo, I., Santos, M., Cantoral, J. M., Collado, I. G. and Rebordinos, L.** (1996). Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* strains. Hereditas 124, 31-38.
- Vallejo, I., Rebordinos, L., Collado, I. G. and Cantoral, J. M. F.** (2001). Differential behaviour of mycelial growth of several *Botrytis cinerea* strains on either Patchoulol- or Globulol-amended media. J. Phytopathology 149, 113-118.
- Vallejo, I., Carbú, M., Muñoz, F., Rebordinos, L. and Cantoral, J. M.** (2002). Inheritance of chromosome-length polymorphisms in the phytopathogenic ascomycete *Botryotinia fuckeliana* (anam. *Botrytis cinerea*). Mycological Research 106, 1075-1085.
- Vallejo, I., Carbu, M., Rebordinos, L., y Cantoral, J.M.** (2003). Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain. Biologia 58:1067-1074.
- Valette–Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. and Boccara, M.** (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 16, pp. 360-367.
- van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G.** (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. Theor Appl Genet 105, 289–29.
- van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., van’t Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M. and van Kan, J. A. L.** (1993). Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. 97, 1193–1200.
- van der Vlugt-Bergmans, C. J. B.** (1996). Genetic variation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. PhD Thesis.

- van Kan, J. A. L., Goverse, A. and Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B.** (1993). Electrophoretic karyotype analysis of *Botrytis cinerea*. Netherlands Journal of Plant Pathology 99, 119-128.
- van Kan, J A L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. TRENDS in Plant Science 11 (5), 247-253.
- van Loon, L. C.** (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119, 243–254.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M. and Ruiz-Roldán, I.** (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. Molecular Ecology 11, 139-151.
- Vilches, S. and Castillo, A.** (1997). A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiological Letters 155, 125-130.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V.G., y Cole, F.M.** (2004). *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology 94, 850-857.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., de Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23, No. 21, 4407-4414.
- Walter, M., Jaspers, M. V., Frampton, C. M. and Stewart, A.** (2001). Control of *Botrytis cinerea* in grape using thyme oil. Australasian Plant Pathology 30, 21–25.
- Weeks, A. R., Van Opijnen, T. and Breeuwer, A. J.** (2000). AFLP fingerprinting for assessing intraspecific variation and genome mapping in mites. Experimental and Applied Acarology 24, 775–793.
- Weir, B.** (1996). Genetic Data Analysis II. Sinauer & Associates, Massachusetts.
- West, J. S., Pearson, S., Hadley, P., Wheldon, A. E., Davis, F. J., Gilbert, A. and Henbest, R. G. C.** (2000). Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. Annals of Applied Biology 136, pp. 115-120.
- Whipps, J. M. and Lumsden, R. D.** (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Fungi as biocontrol agents. Eds. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (CABI: Wallingford, Oxon, UK) pp. 9–22.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y. and Zimand, G.** (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. Mycological Research 99, 1303-1310.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and van Kan, J. A. L.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8(5), 561-580.

- Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M. E.** (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81, 204–210.
- Winfield, M. O., Arnold, G. M., Cooper, F., Le Ray, M., White, J., Karp A., Edwards, K. J.** (1998) A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Mol Ecol* 7:3–10
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. and Chalutz, E.** (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*: 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 245–258.
- Wooten, J. A. and Tolley-Jordan, L. R.** (2009). Validation of phylogenetic signals in amplified fragment length data: testing the utility and reliability in closely related taxa. *BMC Research Notes*, 2:26.
- Wright, S.** (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15, 323–354.
- Xiao, C. L., Chandler, C. K., Price, J. F., Duval, J. R., Mertely, J. C. and Legard, D. E.** (2001) Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease* 85, pp 901-909.
- Xu, J. and Mitchell, T.G.** (2003). Population genetic analysis of medical fungi. Chapter 13. Pp. 703–722. In *Fungi Pathogenic to Human and Animals* (2nd edition).
- Xu, J.** (2004). The prevalence and evolution of sex in microorganisms. *Genome* 47, pp. 775–780.
- Xu, J.** (2006). Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Curr Issues Mol Biol* 8(2), 75-89.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I.** (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas spingae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7343–7353.
- Yeh, F. C., Boyle, T. Y. Z. and Xiyan, J. M.** (1999). PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, USA. 29 p.
- Yourman, L. F., Jeffers, S. N. and Dean, R. A.** (2000). Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 90, pp.851-859.
- Yunis, H. and Elad, Y.** (1989). Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* 17, 13-21.

- Zeid, M., Schön, C.-C. and Link, W.** (2003). Genetic diversity in recent elite faba bean lines using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 107, p. 1304-1314.
- Zhao, M., Zhou, J. Y., Tan, Y. J., Song, W. W., Li, Z. D. and Tan, H.** (2009). Two LTR retrotransposon elements within the abscisic acid gene cluster in *Botrytis cinerea* B05.10, but not in SAS56. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(1), pp. 1-5.
- Zolan, M. E.** (1995). Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59, 686-698.

Páginas web visitadas (Site)

www.sabormediterraneo.com

www.mapa.es

<http://www.sabormediterraneo.com/vinos/uvas.htm>