



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Influencia de las distintas condiciones microclimáticas del viñedo asturiano en la incidencia de determinadas enfermedades fúngicas



Rebeca Fernández Sierra

22 de julio de 2014

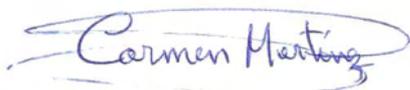
Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Influencia de las distintas condiciones microclimáticas
del viñedo asturiano en la incidencia de determinadas
enfermedades fúngicas**



Rebeca Fernández Sierra



María del Carmen Martínez Rodríguez

María Jesús Cañal Villanueva

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	Antecedentes y planteamiento	1
1.2	Objetivos del trabajo	6
2	Material y métodos	6
2.1	Toma de muestras y diseño experimental	6
2.2	Cuantificación e identificación morfológica mediante microscopía óptica	8
2.3	Identificación de las esporas mediante técnicas moleculares	9
2.3.1	Confirmación de la presencia de los hongos mediante PCR Multiplex	10
2.4	Análisis estadísticos	11
3	Resultados	12
3.1	Análisis estadístico de los datos obtenidos	12
3.1.1	Análisis de Varianza (ANOVA) global	12
3.1.2	Análisis de Varianza (ANOVA) para cada zona vitícola por separado	13
3.1.3	Correlación entre esporas en el aire y patógenos en planta	22
3.2	Resultados obtenidos mediante técnicas moleculares	22
4	Discusión	24
5	Conclusiones	27
6	Referencias bibliográficas	28

Resumen

Al igual que en otras zonas vitícolas del mundo, uno de los hándicaps del viñedo asturiano es su propensión a sufrir enfermedades como el Oídio, el Mildiu y la Botrytis, causadas por los hongos *E. necator*, *P. viticola* y *B. cinerea* respectivamente. El desarrollo y multiplicación de estos hongos en las plantas de vid, depende no solo de las condiciones climáticas generales de la zona, sino también de la concentración de inóculo de los mismos en el entorno del cultivo, así como del microclima específico de cada parcela (*terroir*). En este estudio se analiza la relación existente entre las condiciones climáticas de una parcela situada en Ibias y otra en Cangas del Narcea (Asturias), la concentración de inóculo en el aire de cada patógeno y la presencia o ausencia de síntomas de las distintas enfermedades. En cada parcela se instaló una estación agroclimática, que recogió datos diarios de los distintos parámetros climáticos, así como dos dispositivos, con dos captadores de esporas cada uno, que recogieron las esporas circulantes en el aire mes a mes, durante todo el ciclo vegetativo. Se realizaron conteos de esporas mediante microscopía óptica. Además, se realizaron distintos análisis moleculares. Los datos obtenidos fueron sometidos a diferentes análisis estadísticos. Se comprobó que había diferencias significativas entre las dos zonas de estudio para Mildiu y Oídio, pero no para Botrytis.

Abstract

As in other wine-growing areas of the world, one of the handicaps of the Asturian vineyard is the tendency to develop diseases such as Powdery Mildew, Downy Mildew and Botrytis caused by the fungi *E. necator*, *P. viticola* and *B. cinerea*, respectively. The development of these fungi depends not only of weather conditions in the area, but it also plays an important role the inoculum concentration in the crop environment and the microclimate of each plot (*terroir*). In this research we have analysed the relationship between the climatic conditions of a plot located in Ibias and another in Cangas del Narcea (Asturias). The inoculum concentration in the air of each pathogen and the presence or absence of symptoms of different diseases is also discussed. In each plot it was installed an agroclimatic station to collect different climatic parameters daily. Also they were installed two devices with two sensors each to catch airborne spores monthly throughout the growing season. Spore counts were made by optical microscopy. Additionally, different molecular analyses were performed. The data obtained were subjected to various statistical analyses. It was found that there were significant differences between the two study sites for Downey Mildew and Powdery Mildew, but not for Botrytis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y planteamiento

La zona vitícola asturiana se sitúa en el suroccidente de la comunidad autónoma incluyendo los concejos de Cangas del Narcea, Grandas de Salime, Pesoz, Pola de Allande, Illano e Ibias. Sus características orográficas, valles profundos rodeados de grandes barreras montañosas, dan lugar a la existencia de un microclima óptimo para el desarrollo de la vid, muy diferente al del resto de la comunidad autónoma. Los viñedos se encuentran situados en las laderas soleadas, con fuerte pendiente y una altitud superior a los 400 m (Martínez y Pérez, 2000). Está incluida en lo que se denomina «viticultura heroica», término que incluye la viticultura de montaña, en fuerte pendiente y de pequeñas islas y que supone un 5% de la viticultura mundial (CERVIM, 2014). Dicho término fue propuesto en 1987 por el CERVIM (Centro de Investigación, Estudio, Salvaguarda, Coordinación y Valorización de la Viticultura de Montaña), con sede en el Valle de Aosta (Italia), bajo los auspicios de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino). Entre las características comunes de los viñedos amparados bajo esta categoría, destacan las siguientes: su pequeño tamaño, condiciones climáticas limitantes, variedades autóctonas y con un alto nivel de adaptación a la zona, difícil o imposible mecanización, etc. (CERVIM, 2014).

Aunque se sabe que las características climáticas de los concejos asturianos que conforman la zona vitícola, son idóneas para el desarrollo de la vid, no se conocen con exactitud las condiciones concretas de las distintas áreas de cada uno de ellos, debido a la ausencia de estaciones agroclimáticas, hasta hace apenas unos años. Por consiguiente, no se dispone de una secuencia histórica mínima de parámetros climáticos de las zonas sometidas a estudio. Aunque existe la creencia entre los viticultores de que Ibias presenta mejores condiciones para la maduración de la uva que la zona de Cangas, hasta este momento, únicamente se dispone de la información que se puede extrapolar a partir del tipo de vegetación existente en las diferentes zonas. Así, en la zona de Ibias o Pola de Allande, existen mayores extensiones de madroño (*Arbutus unedo* L.), encontrándose también con frecuencia higueras (*Ficus carica* L.) y acebuches (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot.), vegetación toda ella típica de climas mediterráneos. En Cangas, por el contrario, gran parte del concejo está ocupado por bosques de hayas (*Fagus sylvatica*), castaños (*Castaneda sativa* Mill.) y prados. Por otro lado, en la viticultura de montaña, no solo influyen las condiciones climáticas generales de la zona, sino que el microclima de cada viñedo juega un papel muy importante en el desarrollo del cultivo. Así en función de la altitud, la orografía, o la pendiente del terreno, una parcela puede estar más o menos abrigada de los vientos, recibir mayor o menor insolación, soportar un mayor o menor riesgo de heladas, etc. Todo ello no solo afecta a la maduración de la uva sino también a las condiciones de desarrollo y multiplicación de distintos tipos de hongos causantes de las enfermedades de la vid.

Las variedades mayoritarias en estos viñedos, son las variedades autóctonas Albarín Blanco (B), Albarín Negro (N), Verdejo Negro (N) y Carrasquín (N), además de otras variedades foráneas llegadas a la zona en distintas épocas (Martínez y Pérez, 2000), como el Moscatel de grano menudo Blanco (B), Moscatel de grano menudo Rojo (R), Chasselas Dorée (B), Palomino Fino (B), Cabernet Sauvignon (N), Alicante Henri-Bouschet (N). Algunas de ellas, son de ciclo

muy corto y con un alto nivel de adaptación a la zona, como es el caso del Albarín Blanco, la Chasselas Dorée o el Moscatel de grano menudo Blanco e incluso el Verdejo Negro. Otras, sin embargo, son de ciclo más largo y algunos años presentan problemas de maduración, como es el caso del Carrasquín (Martínez *et al.*, 2013).

La especie *Vitis vinifera*, es sensible a numerosas enfermedades causadas por hongos, como Mildiu (*Plasmopara viticola* (Berk & Curtis) Berl. & de Toni¹), Oídio (*Erysiphe necator* Schw., sinónimo *Uncinula necator* Burr.²) o Botrytis (*Botrytis cinerea* Pers.³) (Galet, 2000). Las dos primeras llegaron a Europa no hace mucho tiempo (finales del siglo XIX), procedentes de América. Rápidamente se extendieron por todo el continente y en pocos años invadieron todos los viñedos incluidos los asturianos (Martínez *et al.*, 2013). La Botrytis sin embargo, es una enfermedad que existe ya desde la antigüedad en nuestro continente. De los problemas que causaba este hongo en determinadas variedades, y en distintas zonas, de cómo el hombre seleccionaba para su cultivo las variedades menos sensibles, o cómo utilizaba determinadas técnicas para disminuir su efecto en los racimos, nos dan ya cuenta autores como Plinio el Viejo (23–79 d.C.) o Abu Zaccaria (siglo XII). Independientemente de su antigüedad en los cultivos (poco más de 100 años las dos primeras enfermedades), lo que es cierto, es que actualmente, tanto unas como otras, constituyen un gran problema en la viticultura mundial provocando grandes pérdidas cada campaña.

Los síntomas de cada una de estas enfermedades son variables dependiendo de la susceptibilidad del tejido huésped (es decir, de la variedad), del órgano que afecten (hoja, brote, zarcillos, racimo...), del estado vegetativo de la planta, o de otros factores como pueden ser las condiciones climáticas en las que se desarrolla la planta (Galet, 2000; Pérez Marín, 1998). Actualmente no existen estudios que nos permitan valorar la incidencia y severidad de estas enfermedades en las distintas variedades autóctonas de Asturias. Sin embargo, los trabajos que viene desarrollando el grupo de viticultura del CSIC (www.mbg.csic.es/vitis/), ponen de manifiesto que algunos años, las condiciones climáticas son propicias para que se produzcan ataques de mayor o menor severidad de algunas de estas enfermedades fúngicas. Concretamente, la temperatura y la humedad son dos de los factores fuertemente limitantes en el desarrollo de estas enfermedades, aunque también influyen otros como la luz, el viento, el tipo de suelo, las prácticas culturales, etc.

La podredumbre gris o Botrytis, producida por el hongo *B. cinerea* (Galet, 2000), es una de las enfermedades más importante a nivel vitícola mundial, con especial incidencia en zonas húmedas donde generalmente produce daños muy significativos en las cosechas, además de reducir considerablemente la calidad del fruto y del vino. Aunque puede afectar a todos los órganos verdes de la planta, donde realmente se producen daños importantes es en los racimos. El hongo se conserva durante el invierno en forma de esclerocios, restos de micelio, o esporas en sarmientos y residuos infectados de la temporada anterior. En primavera, cuando se producen las condiciones óptimas, estas estructuras invernales germinan produciendo gran cantidad de esporas (conidias), que son diseminadas por las gotas de lluvia y viento, infectando los tejidos de hojas, flores y racimos. Las condiciones óptimas para la infección son: temperaturas entre 15 a 20 °C y presencia de agua, o al menos 90 % de humedad relativa, durante unas 15 horas. Una vez producida la infección el tubo germinativo de las conidias penetra en

¹A partir de ahora se citará este hongo por *P. viticola*.

²A partir de ahora se citará este hongo por *E. necator*.

³A partir de ahora se citará este hongo por *B. cinerea*.

las bayas, por lo general, a través de microfisuras producidas por la caída de partes florales, y por los estomas, en el período previo al cierre de racimo. Además, el daño producido por otras enfermedades como el Mildiu o el Oídio, o por heridas causadas por insectos y pájaros, facilita la entrada de la enfermedad en el fruto. A partir del envero o en vendimia por medio de las enzimas del hongo, se produce una penetración directa a través de la epidermis de las bayas.

La sintomatología de la Botrytis es muy diversa. En hoja se producen necrosis, con aspecto de quemaduras, por el borde del limbo y recubiertas de un polvillo gris, en condiciones de humedad. Los brotes jóvenes presentan manchas alargadas de color chocolate recubiertas de pelusilla gris, y los sarmientos, manchas negras y alargadas sobre fondo blanquecino, que producen un mal agostado y poca consistencia de los mismos. En los racimos, durante el periodo entre la floración y el cuajado, aparecen manchas de color chocolate sobre las inflorescencias y en los raspones. En el periodo entre el envero y la maduración, se desarrolla un moho grisáceo característico sobre los granos, apareciendo éstos con un aspecto de pudrición (Galet, 2000).

El Oídio, causado por el patógeno *E. necator*, es una de las enfermedades fúngicas más comunes en los viñedos de zonas cálidas, aunque en determinados años también provoca numerosos daños en zonas vitícolas más húmedas, como Asturias o Galicia (norte y noroeste de España). Se la conoce también con otros nombres como «ceniza», o «cenicilla». Su presencia entre las viníferas es relativamente reciente, ya que como se cita anteriormente, entra en Europa a finales del siglo XIX (Galet, 2000). Las especies americanas son resistentes, mientras que todas las variedades pertenecientes a la especie *Vitis vinifera*, son sensibles en mayor o menor medida. *E. necator* se puede conservar bien como micelio, asociado a yemas infectadas del año anterior, y/o como cleistotecios, los cuales se desarrollan en hojas y otros órganos aéreos de la vid. En zonas húmedas es posible que las ascosporas constituyan la principal fuente de inóculo primario (Pearson & Gadoury, 1987; Jarvis *et al.*, 2002), mientras que en zonas más secas es el micelio asociado a yemas infectadas, la principal fuente de inóculo primario (Pearson & Gärtel, 1985). El ataque del hongo sobre las hojas y brotes se traduce en un menor desarrollo de estos órganos con el consiguiente debilitamiento de la planta. En los racimos los ataques son mucho más dañinos y la susceptibilidad varía a lo largo del ciclo vegetativo, alcanzando la máxima susceptibilidad entre cuajado y el envero (Ypema & Gubler, 2000; Gadoury *et al.*, 2001a). En esta fase, las bayas sufren un daño considerable, empezando por cubrirse de un polvo grisáceo, deteniendo su crecimiento y terminando por agrietarse y dejando la semilla al descubierto. Este proceso favorece además la entrada de otros patógenos como la Botrytis (*B. cinerea*). En otros casos el daño puede afectar muy negativamente a las cualidades organolépticas del vino (Amati *et al.*, 1996; Gadoury *et al.*, 2001b). Entre los factores ambientales que limitan el desarrollo del Oídio, se encuentran la temperatura, la precipitación y la humedad relativa. Temperaturas mayores de 15 °C favorecen el desarrollo y propagación del hongo, encontrándose el rango óptimo entre 24 y 27 °C. Por encima de 33 °C se inhibe la germinación de las conidias. La existencia de un cierto grado de humedad es suficiente para la germinación y desarrollo de *E. necator*, mientras que la precipitación excesiva tiene un efecto negativo en el desarrollo del Oídio. Por este motivo la infección es más severa en climas secos.

El Mildiu, que es otra de las enfermedades de vid que mayores daños causa en las cosechas a nivel mundial, está causado por el oomycete *P. viticola*. Se conoce también con los nombres de «Mildeu» o «Mildíu», términos que proceden de la castellanización de la palabra inglesa *mildew*, que significa moho. Al igual que el Oídio, aparece en Europa en épocas relativa-

mente recientes. Este hongo convivía en América con las especies existentes allí sin causarles ningún daño ya que son resistentes. Su llegada a Europa causó grandes daños en la especie *Vitis vinifera*, a la que pertenecen todas las variedades utilizadas para la elaboración de vinos y que son sensibles a este hongo, aunque unas en mayor medida que otras. Esta enfermedad puede ocasionar grandes pérdidas de producción y de calidad en las plantas afectadas. Donde más a menudo y con mayor facilidad ataca el Mildiu a la planta de vid, es en las hojas y en los racimos. Este hongo, al llegar el otoño, inverna en forma de oosporas (formas de resistencia sexuales) que permanecen en el suelo o en los sarmientos durante la época invernal, de condiciones adversas. En primavera, cuando los brotes han alcanzado una longitud entre 8 y 10 cm y las condiciones climáticas son las idóneas (temperatura mínima 11–13 °C y precipitación de al menos 10 mm durante 1 o 2 días), las oosporas germinan, emitiendo esporangios que, a su vez, liberan zoosporas que se transportan por el aire, agua, etc. hasta las distintas partes verdes de la planta. Una vez allí, pueden germinar y penetrar a través de un estoma (siendo imprescindible para ello la presencia de agua líquida), desarrollándose un micelio que se introduce y se ramifica entre las células de la planta. Este micelio está compuesto por una serie de filamentos denominados hifas y dotados de unos órganos chupadores (haustorios), a partir de los cuales extraen las sustancias nutritivas de las células. Cuando el micelio adquiere un desarrollo conveniente, aparecen por el envés de la hoja las fructificaciones del hongo, esporangióforos y esporangios, en cuyo interior se sitúan las zoosporas que constituyen el inóculo para ciclos sucesivos de infecciones secundarias. La duración de cada ciclo varía entre 5–18 días, dependiendo de la temperatura, humedad o susceptibilidad de cada variedad (Rumbolz *et al.*, 2002). Para que tenga lugar una contaminación primaria, es necesaria la existencia de oosporas maduras, precipitaciones superiores a 10 mm y temperaturas superiores a 12 °C. Las condiciones óptimas para el desarrollo y propagación de *P. viticola* son 25 °C, con una humedad relativa superior al 75 %. Temperaturas inferiores a 10 °C o superiores a 30 °C, inhiben la germinación de los esporangios. (Pearson & Goheen, 1996; Pérez Marín, 1998).

La sintomatología que presenta este hongo es muy diversa. En hoja, los síntomas se observan primeramente sobre el haz, en la parte del limbo situada entre los nervios principales y, con mayor frecuencia, en la parte más próxima al borde de la hoja. Se distinguen fácilmente por la aparición de las denominadas «manchas de aceite», circulares y de color amarillento, como consecuencia de la interrupción de la llegada de la clorofila. Más tarde, adquieren un color pardo-rojizo y, al final del ciclo vegetativo, aparecen manchas de forma poligonal, que son más pequeñas y no localizadas (necrosis de las células). En esta etapa reciben el nombre de «manchas en mosaico». Esta fase de la enfermedad se conoce también con el nombre de «Mildiu de otoño» o «Mildiu de mosaico». En el envés de la hoja, se observa a los pocos días de la infección, la presencia de una pelusilla blanquecina, constituida por numerosos filamentos ramificados, que son las hifas del hongo. Los daños que sufren las hojas son frecuentemente muy graves. Si solo existen manchas aisladas, los efectos son poco importantes, pero muchas veces los ataques son tan intensos que las hojas quedan inutilizadas para cumplir su función asimiladora, y puede incluso llegar a producirse una defoliación, cuya consecuencia es la reducción en el contenido de azúcar de la uva, que luego repercutirá en la calidad de la cosecha.

En racimo, esta enfermedad se manifiesta de dos formas dependiendo de su estado vegetativo. Cuando los racimos son atacados de forma precoz, antes de la floración, se observa un polvillo grisáceo, que continúa con la típica curvatura en «S», así como el oscurecimiento del raquis. Este período se conoce con el nombre de «Mildiu gris del racimo». Después del

cuajado el ataque se puede iniciar en el raquis y pasar a las bayas a través de los pedicelos. Cuanto más jóvenes sean los racimos, más graves son los ataques. En el caso de ataques tardíos, cuando el grano ha alcanzado el tamaño de un guisante, los racimos no se recubren de la típica pelusilla blanquecina, sino que se arrugan, adquieren un color pardo y se secan, dando lugar a lo que se denomina «Rot marrón». Esta fase de la enfermedad es la que se conoce con el nombre de «Mildiu larvado» (Galet, 2000).

Tal y como se ha visto anteriormente para cada hongo en concreto, todos ellos presentan una forma sexual y otra asexual para reproducirse. La forma asexual, sin intervención de elementos masculinos y femeninos, tiene lugar desde la primera infección primaveral hasta el otoño, pasando por diferentes estadios, como zoosporas, esporangióforos y esporangios (en Mildiu), o conidióforos y conidias (en Oídio y Botrytis). Uno de los acontecimientos más importantes en las fases de contaminación del hongo es la formación y la liberación de estos propágulos (esporas, esporangios, conidias, conidióforos...), que son transportados principalmente a través del aire y que al depositarse sobre un nuevo huésped (hojas, brotes, racimos...), se desarrollan provocando enfermedad y actuando a la vez como una nueva fuente de inóculo. La mayor o menor concentración de inóculo (esporas) en el aire es determinante para predecir la agresividad del ataque. Esta concentración puede ser detectada y cuantificada gracias a diferentes técnicas aerobiológicas (instalación en los viñedos de captadores de esporas), que permiten cuantificarla por días u horas y estudiar su relación con las condiciones meteorológicas. De hecho, la existencia de esporas en el aire no siempre desemboca en la presencia de síntomas en la planta, puesto que la multiplicación y el desarrollo de los distintos patógenos depende de las condiciones climáticas acontecidas. Una buena interpretación, análisis y correlación de estos datos, en cada zona vitícola, nos permitirá conocer el riesgo real de aparición de estas enfermedades, y como consecuencia de ello, podremos reducir y planificar los calendarios de tratamientos de una forma más racional y eficaz para cada una de las zonas vitícolas (Montesinos *et al.*, 1995; Bugiani *et al.*, 1996).

Autores de distintas partes del mundo han establecido modelos de predicción para estas tres enfermedades (Mildiu, Oídio y Botrytis) conjugando factores agroclimáticos, estados fenológicos y concentración de esporangios en el aire. Por ejemplo, Carisse *et al.* (2009) desarrollaron un modelo de predicción para Oídio en Quebec (Canadá), teniendo en cuenta la concentración de conidias de *E. necator*, la temperatura y el estado fenológico de las plantas. Calonnec *et al.* (2008) y Caffi *et al.* (2009) desarrollaron modelos para el control de *E. necator* en Italia. Gubler *et al.* (1999) para Francia, Magarey *et al.* (1991) para Australia, etc. Todas estas investigaciones, han permitido crear estaciones de avisos en donde técnicos especialistas, teniendo en cuenta las condiciones meteorológicas, pueden predecir y controlar estas enfermedades y su evolución. Con los modelos de predicción como herramienta, se pueden establecer los momentos de mayor riesgo de infección de los hongos y en función de estos aconsejar la aplicación del tratamiento oportuno en cada momento. Sin embargo, estos modelos no siempre son eficaces al cien por cien en sus predicciones debido, sobre todo, a que en algunos casos no se tiene en cuenta la concentración de esporas de hongo en el aire (de la que depende la capacidad de producir nuevas infecciones). Otro de los factores que impide que la predicción sea eficaz y exacta, es la existencia de zonas con microclimas muy diversos, como el caso de la viticultura de montaña en Asturias (cada parcela presenta un microclima diferente), la información suministrada por las estaciones (muy recientes), solo es válida para un área geográfica muy pequeña. La única solución para evitar este problema, sería la instalación de estaciones

agroclimáticas en los distintos viñedos, que permitiesen tomar datos en función de la altitud, la orografía o la pendiente del terreno, la dirección del viento, etc.

En cuanto a la identificación de las distintas esporas fúngicas presentes en el aire, las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas microscópicas, son dos de las más usadas (Haugland *et al.*, 2002; Falacy *et al.*, 2007; Carisse *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2002).

1.2. Objetivos del trabajo

- (I) Identificación y cuantificación de la concentración de esporas de los hongos responsables del Mildiu (*P. viticola*), Oídio (*E. necator*) y Botrytis (*B. cinerea*) en el aire (mediante la instalación en el viñedo de captadores de esporas), en dos zonas vitícolas asturianas: Ibias (Cecos) y Cangas del Narcea (Carballo). Utilización de técnicas de microscopía óptica y técnicas moleculares.
- (II) Correlacionar la concentración de esporas en el aire de los distintos hongos, con respecto a las condiciones climáticas de cada viñedo.
- (III) Correlacionar la concentración de esporas en el aire (recogidas por los captadores) de cada uno de los hongos, con respecto a la incidencia de cada una de las enfermedades en las variedades objeto de estudio (Albarín Blanco y Verdejo Negro).



Figura 1: Fotografía de la estación agroclimática situada en la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Toma de muestras y diseño experimental

Se tomaron como referencia dos parcelas control de dos zonas separadas geográficamente dentro de la Denominación de Origen Protegida Cangas durante la campaña 2013. Una de ellas situada en el concejo de Cangas del Narcea, en la parroquia de Carballo (valle

del río Cibeja) y la otra situada en el concejo de Ibias, en la parroquia de Cecos (valle del río Ibias). En ambas parcelas se encuentran plantadas las mismas variedades autóctonas de uva, Verdejo Negro (N) y Albarín Blanco (B).

En cada una de las dos parcelas, se dispone de una estación agroclimática (Fig.1) de medición automática (modelo μ MCR200 METOS, Pessl Instruments Ltd.), a partir de la cual se obtuvo registro todo el año de diferentes parámetros (temperatura del suelo, temperatura del aire, temperatura de las hojas, precipitación, humedad relativa, humedad foliar, radiación solar, etc.).

En cada parcela se instalaron dos postes. Uno de ellos se situó contiguo a la estación agroclimática (A) en el entorno de una de las variedades y el otro alejado de ella (B) en el entorno de la otra variedad. En cada poste a su vez, se colocaron dos captadores (Fig.2), uno en la parte media del poste, a 1 m del suelo, y otro más arriba, a 2 m del suelo. El primero de ellos se encontraba a la altura del cuerpo de la cepa, donde se concentra el máximo de vegetación y el segundo justo por encima de la vegetación en espaldera. Cada uno de los captadores llevaba 8 portaobjetos cubiertos con vaselina (sumando un total 16 portaobjetos en cada poste, contando los 8 del captador inferior y los 8 del superior). Dichos captadores recogían las muestras de las diferentes formas fúngicas, presentes en el aire, mediante el método de impactación.

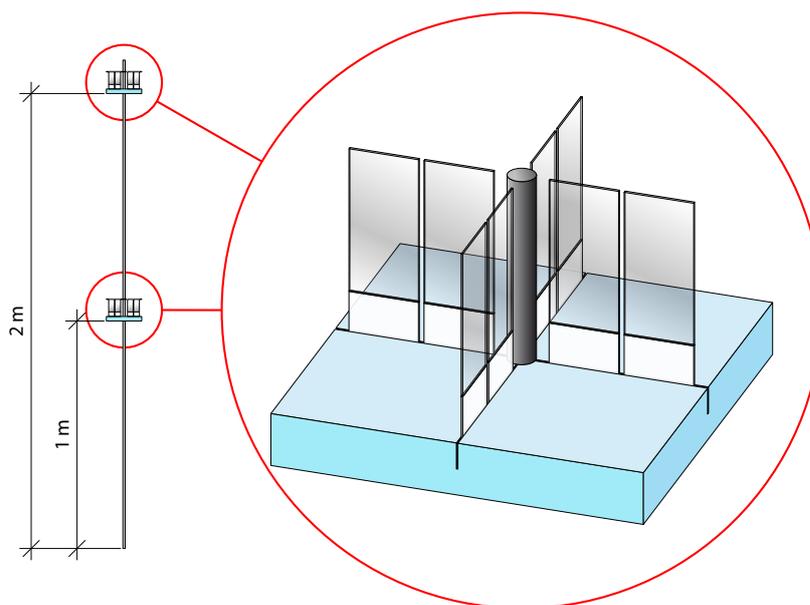


Figura 2: Esquema de los captadores de esporas según método de Díez-Navajas y Ortiz-Barredo (2010), con detalle de la disposición de los portaobjetos en cada soporte.

La recogida de los portaobjetos con las muestras se inició en el mes de mayo y finalizó en septiembre de 2013 (5 muestreos). A lo largo de este tiempo se llevó a cabo, de manera paralela, un seguimiento de la presencia/ausencia de síntomas de las distintas enfermedades, en las variedades Albarín Blanco y Verdejo Negro, en cada una de las dos parcelas. Los muestreos se realizaron en las cepas de esas variedades que estaban próximas a los postes con los captadores. Se tomó como referencia para la observación de síntomas, la fila de cepas en la que estaba situado el poste con los dos captadores.

Para la realización de los muestreos se tuvo en cuenta el estado fenológico de las

variedades, en cada una de las zonas vitícolas estudiadas. Las fechas de realización de los muestreos fueron las siguientes:

Tabla 1: Estados fenológicos en cada una de las parcelas durante el periodo de estudio, según la escala de Baggio- lini (1952).

Muestreo	Localidad	Fecha	Estado fenológico
M1	Carballo	22/05/2013	F-G → Racimos visibles–Racimos separados
M1	Cecos	22/05/2013	G-H → Racimos separados–Botones florales separados
M2	Carballo	21/06/2013	H → Botones florales separados
M2	Cecos	22/06/2013	I → Floración
M3	Carballo	20/07/2013	K → Grano tamaño guisante
M3	Cecos	20/07/2013	K → Grano tamaño guisante
M4	Carballo	20/08/2013	M1 → Inicio de envero
M4	Cecos	21/08/2013	M1 → Inicio de envero
M5	Carballo	20/09/2013	N → Maduración
M5	Cecos	21/09/2013	N → Maduración

2.2. Cuantificación e identificación morfológica de las esporas mediante microscopía óptica

Se recogieron en total 320 muestras (16 portaobjetos \times 2 soportes \times 2 parcelas \times 5 Momentos de Muestreo), que fueron llevadas al laboratorio en condiciones de frío para evitar su deterioro. Una vez en el laboratorio, se realizaron los conteos mediante la observación de los portas a través de un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200) sin necesidad de procesamiento previo ni tinción específica. En cada uno de estos portaobjetos, se hicieron 12 observaciones y recuentos, en 12 campos visuales distribuidos según el esquema de la figura 3 a objetivo $10\times$. Para la realización de este trabajo se tomaron por muestreo 6 portaobjetos de cada uno de los postes de forma aleatoria (tres del captador más alto y tres del situado a nivel de vegetación). Se han hecho por tanto un total de 1 440 observaciones (6 portaobjetos \times 2 soportes \times 2 parcelas \times 5 Momentos de Muestreo \times 12 campos visuales). En cada una de dichas observaciones, se contó el número de esporas de cada tipo de hongo *in vivo*.

Al mismo tiempo que se realizaban los recuentos y observaciones, en cada uno de los portaobjetos analizados, se tomaron fotografías representativas de las esporas de cada tipo de hongo (Fig.4) con el objetivo de $40\times$ y una cámara de microfotografía Nikon DS-Fi1 acoplada al microscopio. Dichas fotografías se volcaron en un procesador de imágenes para ser almacenadas y en trabajos futuros poder ser analizadas morfológicamente (*software* NIS-Elements Basic Research v.3.1.).

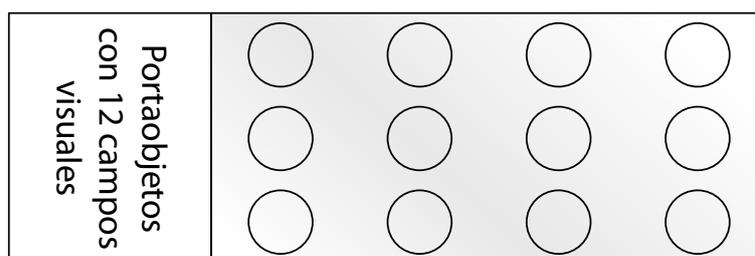


Figura 3: Esquema de distribución de los 12 campos visuales en los portaobjetos estudiados.

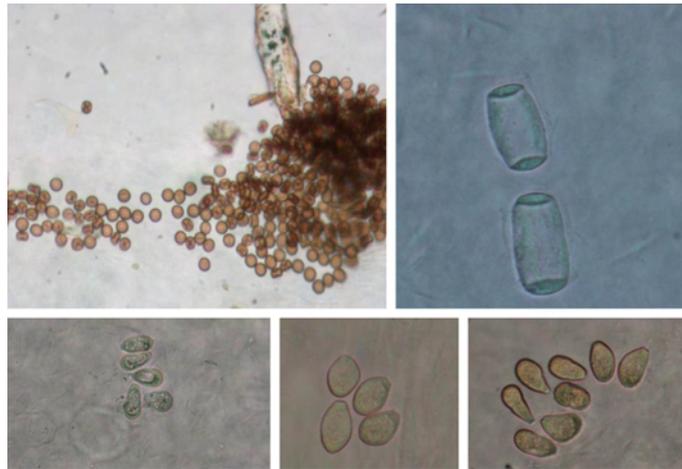


Figura 4: Conidias de Botrytis de la vid (*B. cinerea*), arriba a la izquierda; conidias de Oídio de la vid (*E. necator*), arriba a la derecha; y esporangios de Mildiu de la vid (*P. viticola*) abajo. Todos están fotografiados a 40×.

2.3. Identificación de las esporas mediante técnicas moleculares

Como complemento al conteo visual de esporas de los diferentes patógenos, y para confirmar los resultados obtenidos mediante el mismo, se ha tratado de poner a punto una técnica molecular basada en el aislamiento y posterior amplificación del ADN de las esporas presentes, que confirma la presencia/ausencia de los patógenos sometidos a estudio en los portaobjetos recogidos en campo.

Para el aislamiento del ADN de las distintas esporas presentes en los portaobjetos, se ha desarrollado una técnica basada en el método Bead-beating desarrollado por Chen *et al.* (2002) con algunas modificaciones y complementado con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen).

El primer paso fue la realización de una serie de lavados, con el objetivo de eliminar de la muestra aquellas sustancias que puedan interferir e inhibir posteriormente la reacción de la PCR, como son fertilizantes y fungicidas (especialmente los que contienen cobre). Para ello, se recogió con un bisturí una fina película de parafina superficial de cada portaobjetos y se pasó a un tubo *ependorf* donde se añadieron 200 μ L del *buffer* de lavado WASH A (50 mM Tris-HCl pH=7,5; 200 mM NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 1 mg/mL BSA, 0,5 % de TRITON X-100). Tras añadir el *buffer* se vorteoó durante 1 min, y se incubó a 60 °C durante 5 min para disolver la parafina. Se dejó enfriar, y una vez frío se eliminó el *buffer* Wash A. Se añadieron a continuación 200 μ L de agua milicut, y se vorteoó durante 30 s. Tras esto se repitió el lavado con el *buffer* WASH A. Tras el segundo lavado, se añadieron 200 μ L del *buffer* WASH B (50 mM Tris-HCl pH=7,5; 200 mM NaCl, 50 mM de Sodium Diethyldithiocarbamate trihydrate, 0,1 % de TRITON X-100) y se vorteoó durante 1 min. A continuación se eliminó el *buffer* Wash B y se añadieron 200 μ L de agua milicut. Se vorteoó durante 30 s y se centrifugó a 6 000 rpm durante 3 min. Se repitió el lavado con agua milicut un par de veces más.

A continuación, se procedió a la desparafinación de la muestra. Para ello se probaron tres protocolos diferentes, dos descritos en Meza *et al.* (2013) y uno desarrollado en el laboratorio:

Desp1: Se añadió 1 mililitro de xileno a la muestra y se incubó a 98 °C durante 15 minutos,

se centrifugó, y se descartó el sobrenadante. Al sedimento se le adicionó un mililitro de etanol absoluto, se agitó manualmente, y se dejó en reposo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 11 minutos, se descartó el sobrenadante y se le adicionó un mililitro de etanol a 70 %. Nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm durante diez minutos, se descartó el sobrenadante y con el precipitado se inició la extracción.

Desp2: Se añadieron 750 microlitros de xileno y se incubó durante 10 minutos en un baño a 75 °C; se centrifugó a 10 000 rpm durante 7 minutos y se retiró el sobrenadante. Este proceso se repitió otra vez; al finalizar se añadió 1 mililitro de etanol absoluto, se procedió a incubar la muestra a 37 °C durante 10 minutos y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos, con la posterior retirada del sobrenadante. Este proceso se repitió de nuevo, pero esta vez usando etanol 70 % y con el precipitado resultante se inició la extracción.

Desp3: Se añadió a la muestra 1 mililitro de xileno y tras mezclarla con el vórtex durante 30 segundos, se centrifugó a 12 000 rpm durante cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y se repitieron los pasos anteriores. A continuación se hicieron dos lavados usando 1 mililitro de etanol absoluto, agitación y centrifugación durante 2 minutos. Se dejó evaporar el etanol y se añadieron 5 microlitros de tampón de PCR, 45 microlitros de agua milicut y 5 microlitros de proteinasa K. Se incubó todo a 56 °C durante una hora. A continuación se hirvió la muestra en el tubo durante 8–10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sobrenadante se utilizó como ADN directamente para hacer la PCR.

Tras todo este proceso, se procedió a la extracción de ADN. Para ello se añadieron 20 μ L de agua destilada al precipitado resultante de la desparafinación, junto con el mismo volumen de beads (Acid-Washed Glass Beads \leq 106 μ m, Sigma–Aldrich). A continuación se añadió el *buffer* de lisis perteneciente al kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen), y se procedió a la ruptura de las esporas utilizando un molino (Retsch, MM300). Se continuó la extracción siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Una vez extraído el DNA, se continuó con la detección de la presencia de los patógenos, a través de una PCR (Polymerase Chain Reaction) Multiplex, donde se utilizaron oligos específicos de cada patógeno.

2.3.1. Confirmación de la presencia de los hongos mediante PCR Multiplex

Para la detección del ADN de los hongos, se realizó una PCR Multiplex usando «primers» específicos para cada patógeno, que ya habían sido testados previamente en muestras de ADN. La PCR Multiplex se estandarizó y ajustó hasta conseguir la amplificación de un fragmento de 208 pares de bases específico de Mildiu (determinado por los oligos GIOP-F y GIOP-R), un fragmento amplificado usando los oligos mo3E11-F y mo3E11-R que puede presentar tres tamaños diferentes, dependiendo de la raza específica de Oídio que se esté amplificando (131, 150, 221), y un fragmento amplificado usando el par oligos Bc6-F y Bc6-R, que contiene un microsatélite, dando lugar a fragmentos de tamaños entre 88 y 158 pares de bases para Botrytis. Como alternativa se realizó una Multiplex que amplificó los marcadores GIOP, UNCIN

y BC108/BC563 (específicos respectivamente de Mildiu, Oídio) de Botrytis). La información de todos los oligos se muestra resumida en la tabla 2, que aparece a continuación:

Tabla 2: Resumen de los diferentes oligos utilizados.

Nombre	Secuencia	Patógeno	Fragmento amplificado	Referencia
GIOP-F GIOP-R	TCCTGCAATTCGCATTACGT GGTTGCAGCTAATGGATTCCCTA	Mildiu	208	Valsesia <i>et al.</i> (2005)
mo3E11-F mo3E11-R	TTGGCTGGCTGTTGTGGT CCGCGTGAAGTTGAAGATTT	Oídio	221/150/131	Péros <i>et al.</i> (2006)
Bc6-F Bc6-R	ACTAGATTCGAGATTCAGTT AAGGTGGTATGAGCGGTTTA	Botrytis	88-158	Fournier <i>et al.</i> (2002)
UNCIN144 UNCIN511	CCGCCAGAGACCTCATCCAA TGGCTGATCAGGAGCGTCAC	Oídio	367	Falacy <i>et al.</i> (2007)
BC108+ BC563-	ACCCGCACCTAATTCGTCAAC GGGTCTTCGATACGGGAGAA	Botrytis	475/360	Rigotti <i>et al.</i> (2006)

La reacción de PCR se llevó a cabo usando los reactivos a las concentraciones y volúmenes que se reflejan en la tabla 3.

Tabla 3: Composición del «mix» utilizado en la PCR.

Componentes de la PCR (Concentración stock)	Concentración final	Volumen (μL)
H ₂ O milicut		7
Buffer (10 \times)	0,5 \times	4
dNTPs	0,075	0,4
Oligo GIOP-F (25 μM)		0,05
Oligo GIOP-R (25 μM)		0,05
Oligo mo3E11-F (25 μM)		0,3
Oligo mo3E11-R (25 μM)		0,3
Oligo Bc6-F (10 μM)		0,5
Oligo Bc6-R (10 μM)		0,5
BSA (10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	1
Taq ADN polimerasa (5 U/ μL)	0,5 U	0,1
ADN		8
Volumen total de reacción		20

La reacción de PCR se realizó usando placas de 96 pocillos y un termociclador Perkin, y sus condiciones se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones específicas de la PCR Multiplex.

Condiciones PCR			
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	53 °C	30 segundos	
Elongación	72 °C	30 segundos	
Elongación final	72 °C	10 minutos	

2.4. Análisis estadísticos

La concentración de esporas en el aire de cada una de los patógenos evaluados se sometió a un Análisis de Varianza (ANOVA), para comprobar si había diferencias significativas, al 99,9%, 99% y 95%, entre las distintas zonas vitícolas estudiadas. Se realizó la prueba F

de significación contrastando cada factor fijo frente a su error. Todos los parámetros que en el análisis de varianza mostraron una F significativa, se sometieron a una comparación de medias, mediante la prueba de la Mínimas Diferencias Significativas (MDS) protegida de Fisher (Steel & Torrie, 1980).

3. RESULTADOS

3.1. Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la cuantificación y caracterización morfológica de las esporas mediante microscopía óptica

3.1.1. Análisis de Varianza (ANOVA) global y comparación de medias, con todas las muestras de esporas en el aire recogidas, en las zonas vitícolas de Cecos (Ibias) y Carballo (Cangas del Narcea)

Se realizó un primer Análisis de Varianza global con todas las muestras de esporas recogidas. Los parámetros evaluados fueron: Concentración de esporangios de Mildiu (M), Concentración de conidias de Botrytis (B), Concentración de conidias de Oídio (O).

Las fuentes de variación fueron: Zona vitícola (2 Zonas vitícolas, Cecos en Ibias y Carballo en Cangas del Narcea), Momento del Muestreo (5 Muestreos, M1, M2, M3, M4, M5), Zona dentro de la parcela (Captador A, rodeado por la variedad Verdejo Negro y Captador B rodeado por la variedad Albarín Blanco), Altura del captador (Superior e Inferior. Las dos alturas a las que se colocan los captadores en un mismo poste).

Los resultados para este primer análisis (tabla 5) muestran en general, que para todos los parámetros medidos, solo existen diferencias significativas entre las dos Zonas vitícolas. Cada uno de los parámetros muestra diferencias significativas en función de la fuente de variación. Así, si analizamos cada uno de los parámetros por separado, se observa lo siguiente:

- **Concentración de esporangios de Mildiu:** Existen diferencias significativas para Zona vitícola, Altura del captador, Momento del Muestreo y en las interacciones Zona vitícola \times Momento del Muestreo, Zona vitícola \times Altura del captador, Altura del captador \times Momento del Muestreo y Zona vitícola \times Altura del captador \times Momento del Muestreo.
- **Concentración de conidias de Oídio:** Existen diferencias significativas para Zona vitícola, Altura del captador, Momento del Muestreo, Zona dentro de la parcela y en las interacciones Zona vitícola \times Momento del Muestreo, Altura del captador \times Momento del Muestreo y Zona vitícola \times Altura del captador \times Momento del Muestreo.
- **Concentración de conidias de Botrytis:** Solamente existen diferencias significativas para Zona vitícola y para la interacción Momento del Muestreo \times Zona dentro de la parcela.

En la tabla 6 se muestran los valores medios de cada una de las variables analizadas, con la Mínimas Diferencias Significativas (MDS).

Tabla 5: Resultados del Análisis de Varianza global realizado para los parámetros analizados: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Oídio, Concentración de conidias de Botrytis. Nivel de significación para cada uno de ellos.

FUENTES DE VARIACIÓN	Nivel de Significación		
	Esporangios Mildiu	Conidias Oídio	Conidias Botrytis
Zona vitícola	99,00 %	99,00 %	95,00 %
Altura del captador	99,00 %	99,00 %	n.s.
Momento del Muestreo	99,00 %	99,00 %	n.s.
Zona dentro de la parcela	n.s.	99,00 %	n.s.
Zona V. × Altura	99,00 %	n.s.	n.s.
Zona V. × Muestreo	99,00 %	99,00 %	n.s.
Zona V. × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Zona V. × Altura × Muestreo	99,00 %	95,00 %	n.s.
Zona V. × Altura × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Zona V. × Altura × Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Altura × Muestreo	99,00 %	95,00 %	n.s.
Altura × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	95 %
Altura × Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 6: Valores medios y Mínimas Diferencias Significativas (MDS) para los parámetros analizados: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Botrytis, Concentración de conidias de Oídio.

FUENTES DE VARIACIÓN		Parámetros medidos		
		Esporangios Mildiu	Conidias Botrytis	Conidias Oídio
Zona vitícola	Cecos	173,87a	16,52b	14,55a
	Carballo	7,37b	105,08a	6,267b
	MDS(0,05)	57,442	83,215	4,6259
Altura del captador	Superior	101,58a	96,96a	12,944a
	Inferior	24,16b	54,17a	5,111b
	MDS(0,05)	54,157	78,456	4,3613
Momento del muestreo	M1	0c	17,56b	14,056a
	M2	0,86c	122,31ba	18,444a
	M3	50,53bc	29,81b	3,944b
	M4	94,11ba	14,28b	4,306b
	M5	168,83a	193,86a	4,389b
	MDS(0,05)	85,63	124,05	6,8959
Zona dentro de la parcela	A	65,4a	91,02a	12,033a
	B	60,33a	60,10a	6,022b
	MDS(0,05)	54,157	78,456	4,3613

Debido a la existencia de las interacciones significativas para algunos de los parámetros medidos como por ejemplo para zonas vitícolas o para la interacción Zona vitícola × Altura del captador × Momento del Muestreo, se realizó un Análisis de Varianza para cada Zona vitícola por separado, mostrando los resultados a continuación.

3.1.2. Análisis de Varianza (ANOVA) para cada zona vitícola por separado

3.1.2.1. Zona Vitícola: Cecos (Ibias)

En la tabla 7 se exponen los resultados del Análisis de Varianza para la zona vitícola de Cecos y en la tabla 8, se muestran los valores medios de cada una de las variables analizadas, con la Mínimas Diferencias Significativas (MDS).

Tabla 7: Resultados del Análisis de Varianza global en la localidad de Cecos realizado para los parámetros analizados: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Oídio, Concentración de conidias de Botrytis. Nivel de significación para cada uno de ellos.

FUENTES DE VARIACIÓN	Nivel de Significación		
	Esporangios Mildiu	Conidias Oídio	Conidias Botrytis
Altura del captador	95,00 %	95,00 %	n.s.
Momento del Muestreo	95,00 %	99,00 %	n.s.
Zona dentro de la parcela	n.s.	n.s.	n.s.
Altura × Muestreo	95,00 %	n.s.	n.s.
Altura × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Altura × Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 8: Valores medios y Mínimas Diferencias Significativas (MDS), para los parámetros tomados en la parcela de Cecos: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Botrytis, Concentración de conidias de Oídio.

FUENTES DE VARIACIÓN		Parámetros medidos		
		Esporangios Mildiu	Conidias Botrytis	Conidias Oídio
Altura del captador	Superior	284,8a	26,47a	21,167a
	Inferior	62,93b	6,57a	7,933b
	MDS(0,05)	178,98	35,889a	12,949
Momento del Muestreo	M1	0b	3a	21b
	M2	2,6b	42,92a	44,83a
	M3	151,6b	20,75a	2,67cb
	M4	271,8ba	12a	3,92cb
	M5	443,3a	3,92a	0,33c
	MDS(0,05)	282,99	56,746	20,474
Zona dentro de la parcela	A	177,8a	14,53a	16,7a
	B	169,93a	18,5a	12,4a
	MDS(0,05)	178,98	35,889	12,949

- **Concentración de esporangios de Mildiu:** Solo se observaron diferencias significativas (95 %) entre Altura del captador, Momento del Muestreo y para la interacción Altura del captador × Momento del Muestreo (tabla 7).

En función de la Altura del captador, la concentración de este tipo de esporangios fue cuatro veces mayor en el captador de la parte superior del poste que en el de la inferior (tabla 8).

En función del Momento del Muestreo: Se observó que la concentración de esporangios variaba en función del momento del Muestreo y que esta aumentaba de forma cronológica, es decir que era más baja en el primero y más alta en el quinto muestreo. Se diferenciaron significativamente dos grupos. Un primer grupo formado por los Muestreos 1, 2 y 3, en el que se observaba la menor concentración de este tipo de esporangios. Un segundo grupo, formado por los Muestreos 4 y 5, que presentaban la mayor concentración (tabla 8).

Interacción Altura del captador × Momento del Muestreo: Aunque en general, la concentración de esporangios fue mayor en el captador situado en la parte superior del poste que en el de la parte inferior, en el Muestreo 2 la concentración fue mayor en el captador de la parte inferior del poste.

- **Concentración de conidias de Oídio:** Se observaron diferencias significativas entre Altura del captador (95 %) y Momento del Muestreo (99 %) (tabla 7).

En función de la Altura del captador, la concentración de este tipo de conidias fue mayor en el captador situado en la parte superior del poste, que en el situado en la parte inferior (tabla 8).

En función del Momento del Muestreo: La mayor concentración de conidias se observó en los Muestreos 1 y 2, y la menor en el resto de los Muestreos (tabla 8).

- **Concentración de conidias de Botrytis:** No se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados.

En las siguientes figuras (desde la figura 5 hasta la figura 8), se representan la concentración de esporangios o conidias de cada uno de los patógenos estudiados, por separado y frente a las variables Precipitación acumulada, Temperatura, y Punto de rocío durante el periodo de estudio.

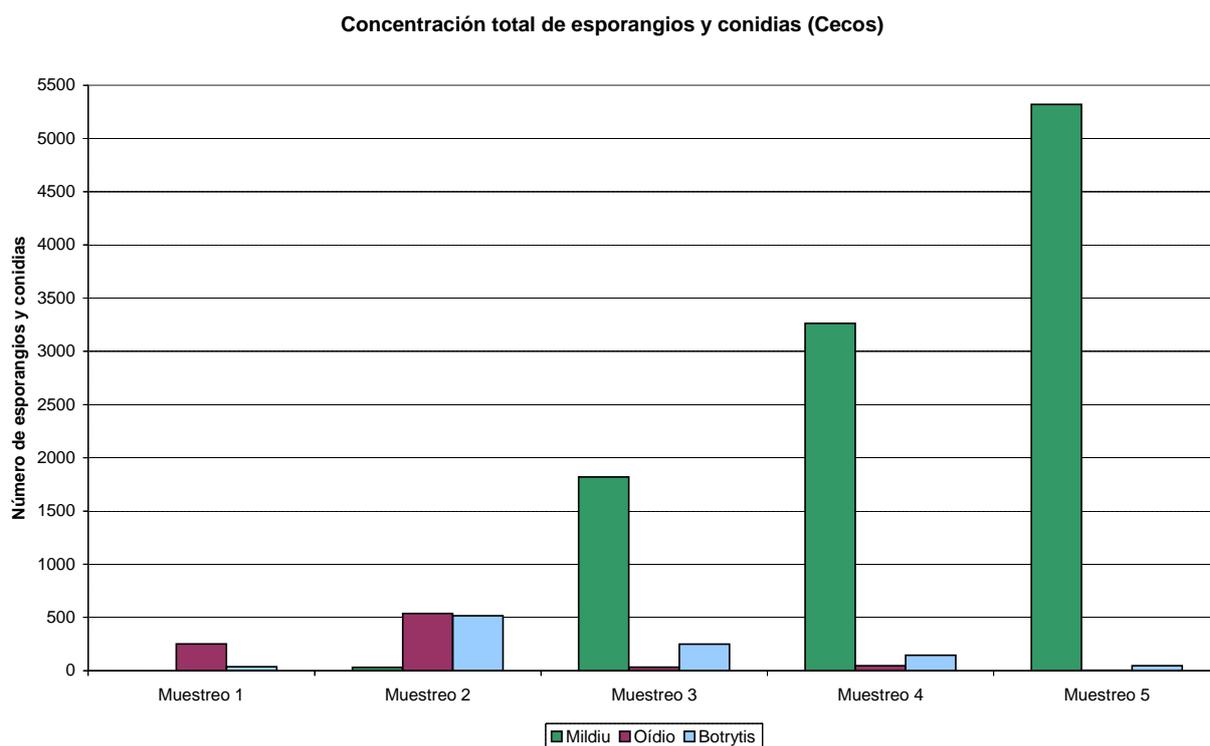


Figura 5: Número de esporangios de Mildiu y de conidias de Oídio y Botrytis durante todos los Momentos del Muestreo en la parcela de Cecos (Ibias).

Comparación Mildiu y Oídio - Precipitación acumulada (Cecos)

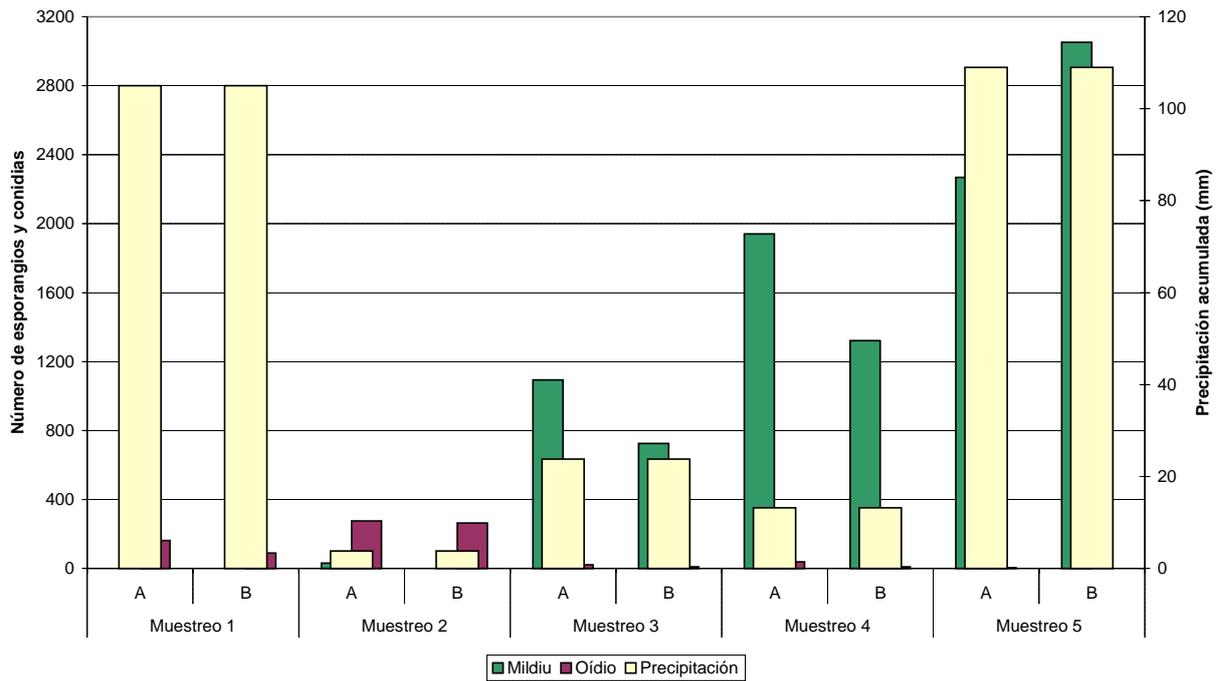


Figura 6: Precipitación acumulada frente a número de esporangios de Mildiu y conidias de Oídio, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Cecos (Ibias).

Comparación Mildiu y Oídio - Temperatura (Cecos)

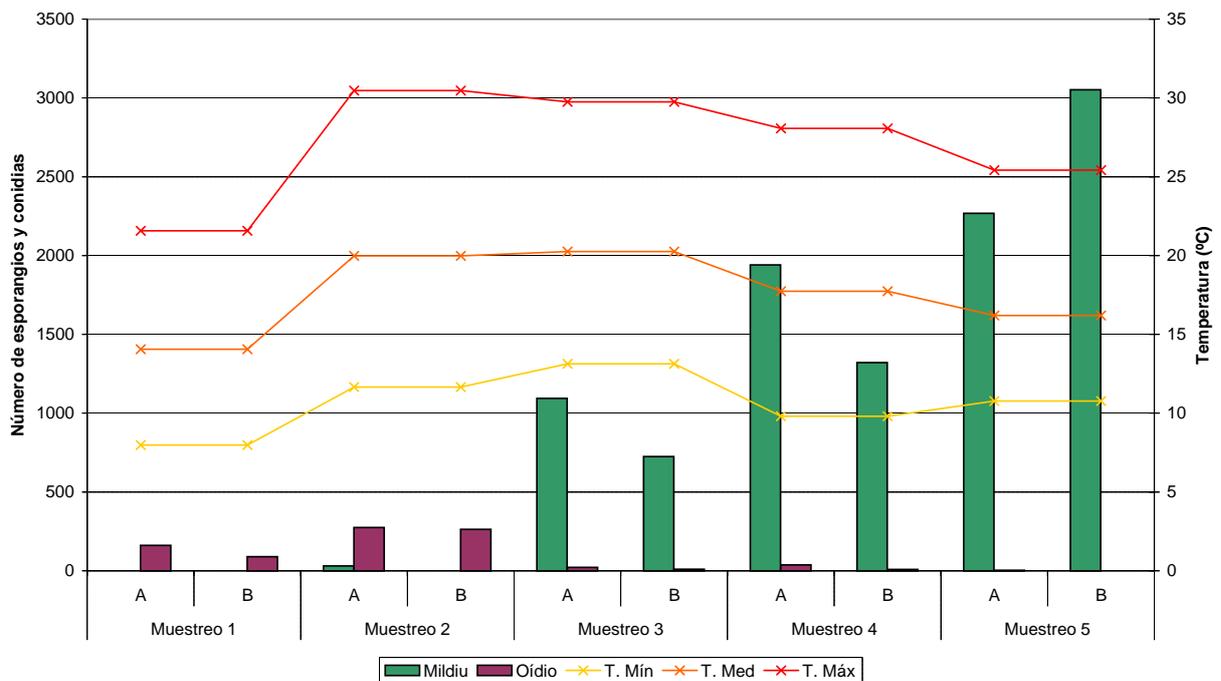


Figura 7: Temperatura (media, máxima y mínima) frente a número de esporangios de Mildiu y conidias de Oídio, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Cecos (Ibias).

Comparación Botrytis - Temperatura (Cecos)

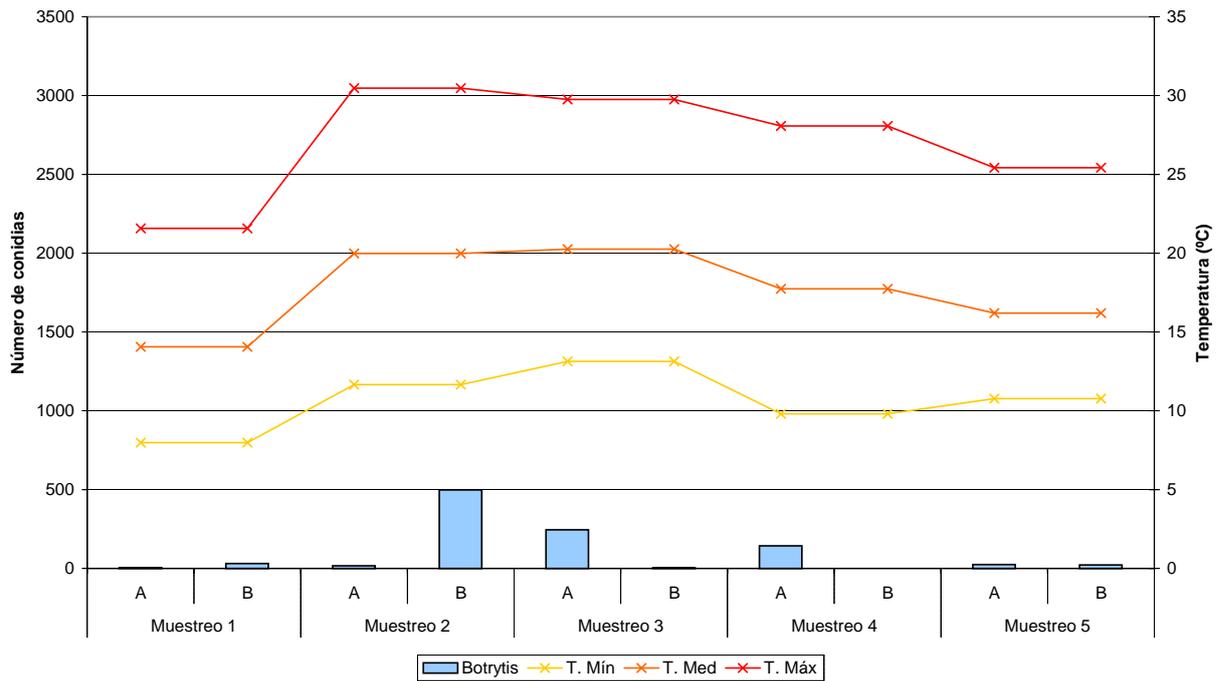


Figura 8: Temperatura (media, máxima y mínima) frente a número de conidias de Botrytis, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Cecos (Ibias).

Comparación Botrytis - Punto de rocío promedio (Cecos)

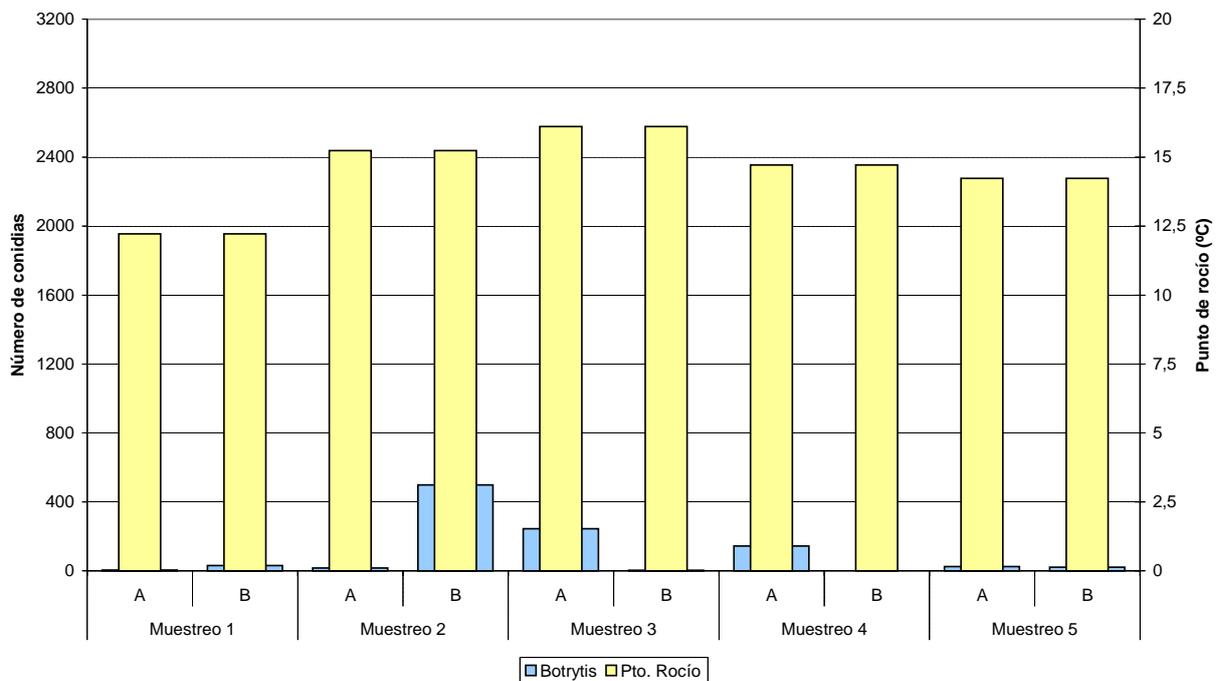


Figura 9: Punto de rocío frente a número de conidias de Botrytis, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Cecos (Ibias).

3.1.2.2. Zona Vitícola: Carballo (Cangas del Narcea)

En la tabla 9 se exponen los resultados del Análisis de Varianza para la zona vitícola de Carballo y en la tabla 10 se muestran los valores medios de cada una de las variables analizadas, con la Mínimas Diferencias Significativas (MDS).

Tabla 9: Resultados del Análisis de Varianza global en la localidad de Carballo realizado para los parámetros analizados: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Botrytis, Concentración de conidias de Oídio. Nivel de significación para cada uno de ellos.

FUENTES DE VARIACIÓN	Nivel de Significación		
	Esporangios Mildiu	Conidias Oídio	Conidias Botrytis
Altura del captador	n.s.	95,00 %	n.s.
Momento del Muestreo	99,00 %	n.s.	n.s.
Zona dentro de la parcela	n.s.	99,00 %	n.s.
Altura × Muestreo	n.s.	n.s.	n.s.
Altura × Zona P.	95,00 %	n.s.	n.s.
Muestreo × Zona P.	n.s.	n.s.	n.s.
Altura × Muestreo × Zona P.	95,00 %	n.s.	n.s.

Tabla 10: Valores medios y Mínimas Diferencias Significativas (MDS), para los parámetros tomados en la parcela de Carballo: Concentración de esporangios de Mildiu, Concentración de conidias de Botrytis, Concentración de conidias de Oídio.

FUENTES DE VARIACIÓN		Parámetros medidos		
		Esporangios Mildiu	Conidias Botrytis	Conidias Oídio
Altura del captador	Superior	9,967a	132,2a	8,833a
	Inferior	4,833a	77,97a	3,7b
	MDS(0,05)	8,6715	182,01	4,5303
Momento del Muestreo	M1	0b	24,8a	10,583a
	M2	0b	162a	5,25a
	M3	0,167b	34,3a	4,583a
	M4	5,25b	15,4a	4,5a
	M5	31,583a	288,8a	6,417a
	MDS(0,05)	13,711	287,78	7,163
Zona dentro de la parcela	A	9,2a	129,27a	9,7a
	B	5,6a	80,9a	2,833b
	MDS(0,05)	8,6715	182,01	4,5303

- **Concentración de esporangios de Mildiu:** Solo se observaron diferencias significativas para Momento del Muestreo (99 %) y para las interacciones Altura del captador × Zona dentro de la parcela y Altura del captador × Momento del Muestreo × Zona dentro de la parcela (tabla 9).

En función del Momento del Muestreo: Se observó que la concentración de esporangios variaba en función del momento del Muestreo. Se diferenciaron significativamente dos grupos. Un primer grupo formado por los cuatro primeros muestreos, en el que se observó la menor concentración de este tipo de esporangios. En algunos casos muy bajo incluso inexistente, como en los dos primeros muestreos. Un segundo grupo, formado por el Muestreo 5 que presentaba la mayor concentración (tabla 10).

Interacción Altura del captador × Zona dentro de la parcela: la concentración de esporangios fue mayor en el captador situado en la parte superior del poste situado en la Zona A de la parcela, mientras que en el poste situado en la Zona B de la

parcela la concentración de esporangios fue mayor en el captador situado en la parte inferior del poste.

Interacción Altura del captador \times Momento del Muestreo \times Zona dentro de la parcela: Aunque en general, la concentración de esporangios fue mayor en el captador situado en la parte superior del poste que en el situado en la parte inferior y en el poste situado en la Zona A de la parcela, en el Muestreo 3, la concentración fue mayor en el captador situado en la parte inferior del poste situado en la Zona B de la parcela.

- **Concentración de conidias de Oídio:** Se observaron diferencias significativas entre Altura del captador (95 %) y Zona dentro de la parcela (99 %) (tabla 9).

En función de la Altura del captador, la concentración de este tipo de conidias fue mayor en el captador situado en la parte superior del poste que en el situado en la parte inferior (tabla 10).

En función de la Zona dentro de la parcela: La mayor concentración de conidias se observó en la zona A dentro de la parcela con respecto a la zona B (tabla 10).

- **Concentración de conidias de Botrytis:** Al igual que para la zona vitícola de Cecos, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados.

En las siguientes figuras (desde la figura 10 hasta la figura 13), se representan la concentración de esporangios o conidias de cada uno de los patógenos estudiados, por separado y frente a las variables Precipitación acumulada, Temperatura, y Punto de rocío durante el periodo de estudio.

Concentración total de esporangios y conidias (Carballo)

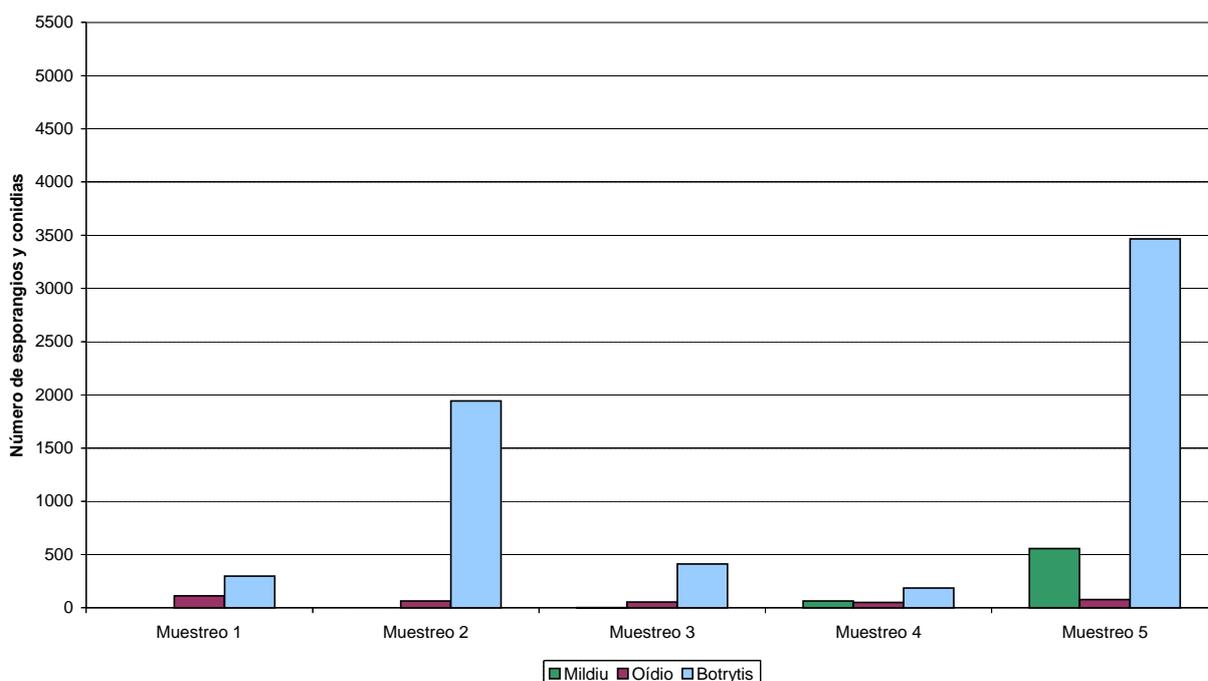


Figura 10: Número de esporangios de Mildiu y de conidias de Oídio y Botrytis durante todos los Momentos del Muestreo en la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

Comparación Mildiu y Oídio - Precipitación acumulada (Carballo)

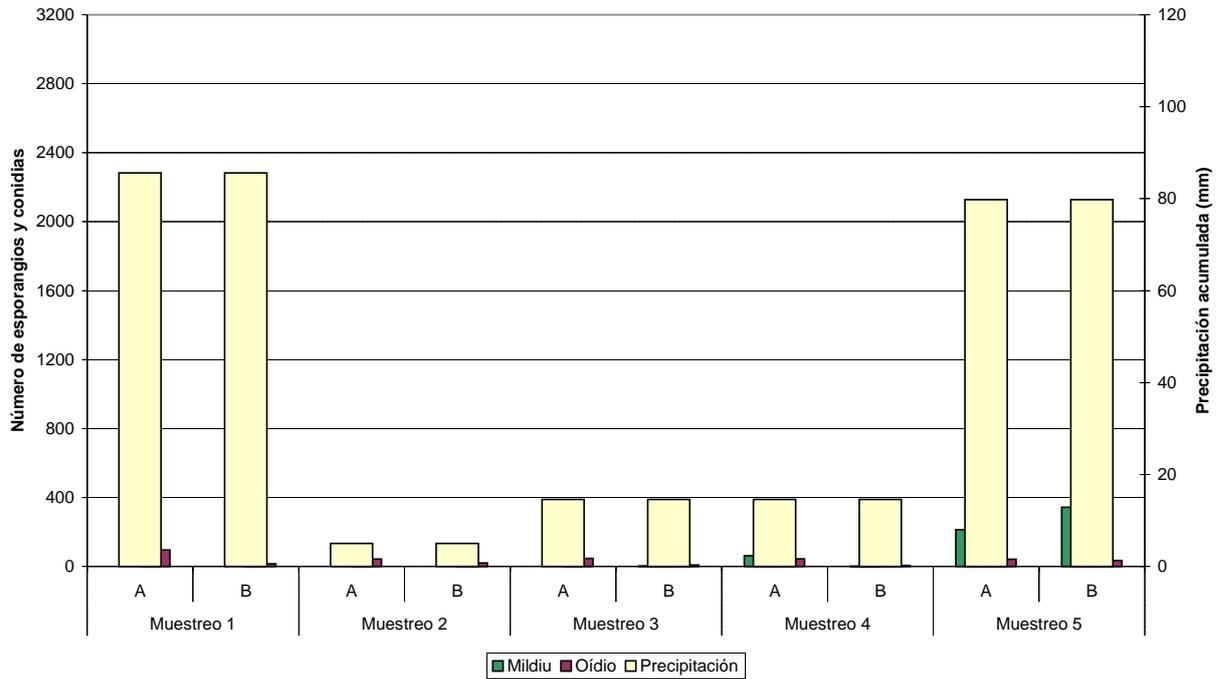


Figura 11: Precipitación acumulada frente a número de esporangios de Mildiu y conidias de Oídio, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

Comparación Mildiu y Oídio - Temperatura (Carballo)

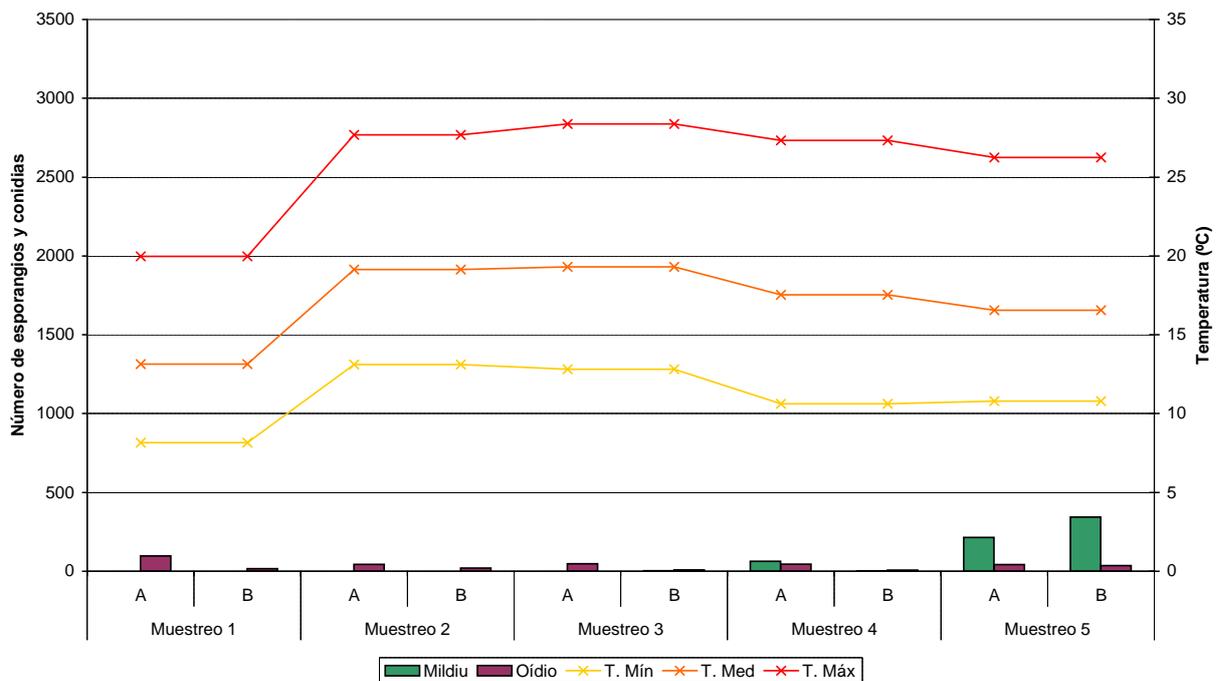


Figura 12: Temperatura (media, máxima y mínima) frente a número de esporangios de Mildiu y conidias de Oídio, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

Comparación Botrytis - Temperatura (Carballo)

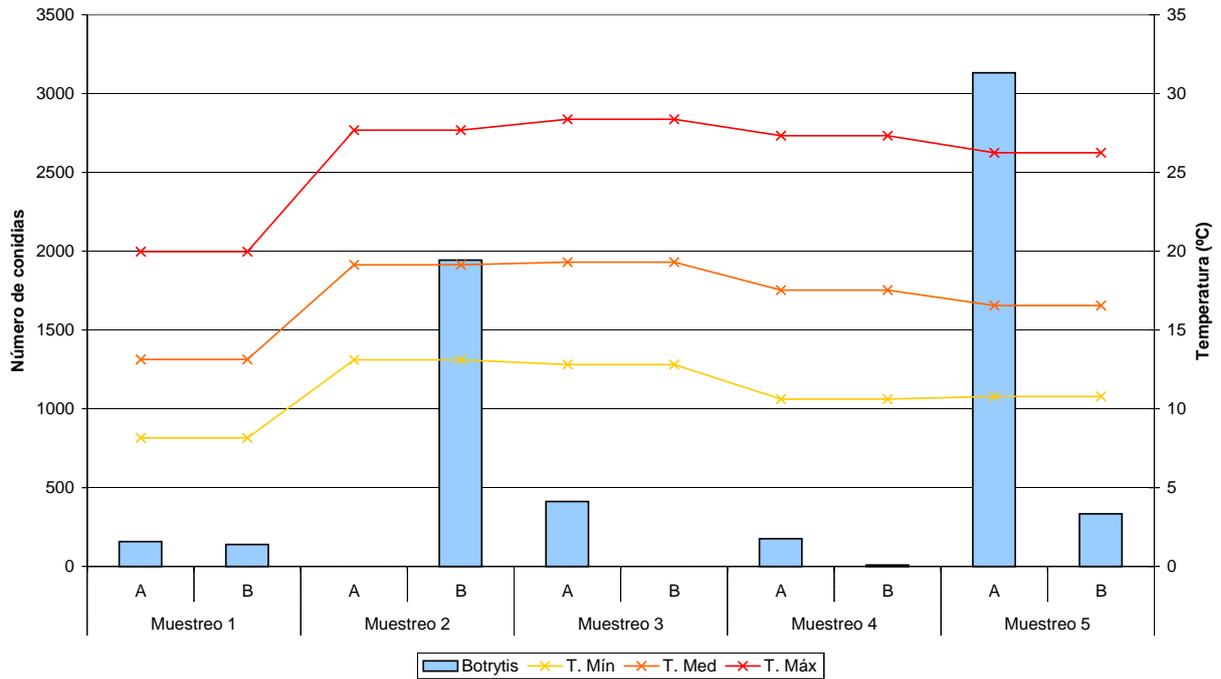


Figura 13: Temperatura (media, máxima y mínima) frente a número de conidias de Botrytis, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

Comparación Botrytis - Punto de rocío promedio (Carballo)

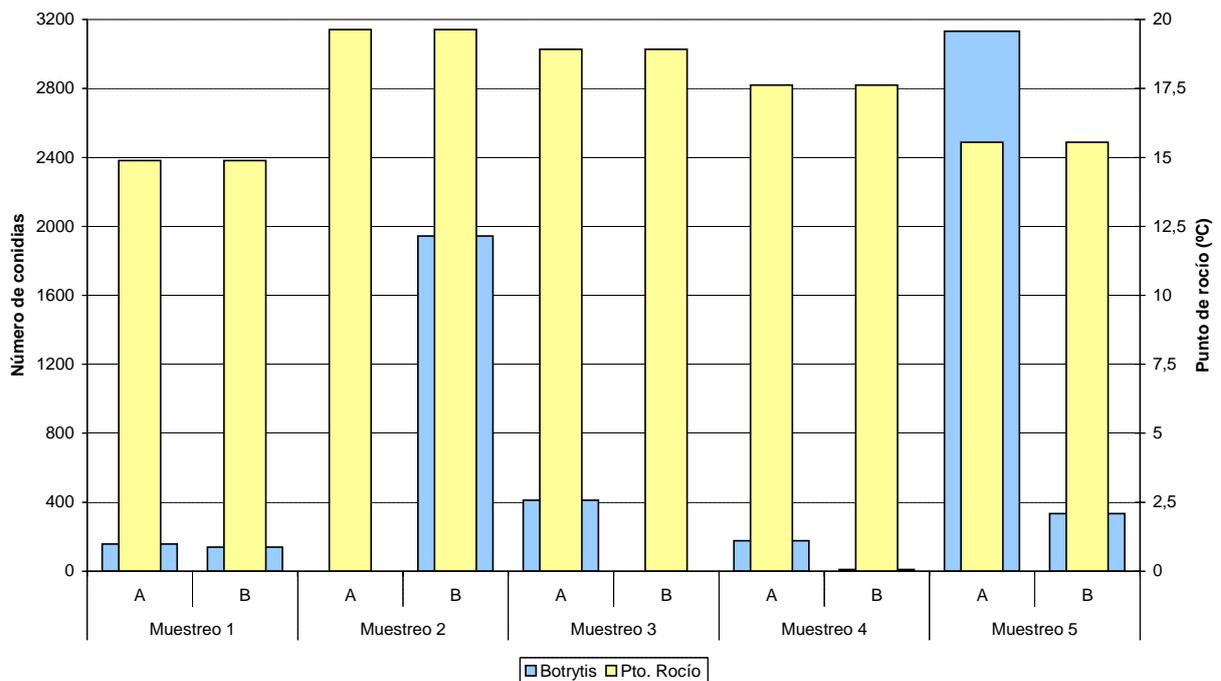


Figura 14: Punto de rocío frente a número de conidias de Botrytis, para los captadores situados en las Zonas A y B de la parcela de Carballo (Cangas del Narcea).

3.1.3. Correlación entre la concentración de esporas en el aire de los diferentes hongos en cada zona vitícola y la presencia/ausencia de estos patógenos en planta en las dos zonas vitícolas

En la tabla 11 se muestra la presencia/ausencia de cada una de estas enfermedades, en diferentes fechas de muestreo, en las variedades Albarín Blanco y Verdejo Negro en ambas zonas vitícolas.

Tabla 11: Presencia de síntomas de Mildiu, Oídio y Botrytis en la parcelas de Cecos (Ibias) y Carballo (Cangas del Narcea).

Localidad	Muestreo	Botrytis	Oídio	Mildiu
Cecos	M1	No presencia	No presencia	No presencia
	M2	BTHA	No presencia	No presencia
	M3	BTHA	No presencia	MHA, MHB
	M4	BTHA	ORA, ORB	MHA, MRC, MHB, MHC
	M5	BTHA	ORA, ORB	MHC, MRC, MHA, MHB
Carballo	M1	No presencia	No presencia	No presencia
	M2	BTHA	No presencia	No presencia
	M3	BTHA	No presencia	No presencia
	M4	BTHA	No presencia	No presencia
	M5	BTHA	OHA, OHB	No presencia

3.2. Resultados de la cuantificación y caracterización de las esporas mediante técnicas moleculares

Tras un lavado previo de la muestra para eliminar pesticidas y fungicidas se analizaron los diferentes protocolos sin desparafinación y con desparafinación (Desp1, Desp2 y Desp3). Posteriormente se llevó a cabo la extracción con Acid Washed Beads (AWB) en el caso de las muestras que no habían sido sometidas a desparafinación y con AWB combinada con el kit comercial de Qiagen, en el caso de las muestras que habían sido sometidas a desparafinado. Las muestras desparafinadas con los protocolos Desp1 y Desp2, en las que se extrajo el ADN usando el método combinado, tuvieron un buen resultado de amplificación del fragmento asociado al marcador GIOP. También se detectó una buena amplificación en las muestras extraídas directamente con el método de extracción combinado, sin desparafinado previo. Los otros métodos analizados dieron resultados muy pobres o negativos. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió el protocolo de Desp2 y el método combinado de extracción de ADN, para realizar el análisis de nuestras muestras de campo, ya que aunque no ha habido interferencias en la amplificación de GIOP en las muestras no desparafinadas, extraídas con el método combinado, es posible que al tratar de realizar la PCR Multiplex se produjesen problemas en la amplificación de otros fragmentos. Es ampliamente conocida la existencia de problemas de interferencia de la parafina en la PCR. Los resultados se muestran en la figura 15.

Tras la estandarización de la PCR Multiplex se amplificaron tres marcadores específicos para cada uno de los patógenos, pero el resultado fue demasiado débil como para poder ser resolutivo (Fig.16).

A la vista de este resultado se procedió a la estandarización de una Multiplex, esta vez usando marcadores que habían presentado previamente una gran amplificación en otras muestras analizadas de esporas de los distintos patógenos. En este caso se analizaron los marcadores GIOP, UNCIN y BC108/263, pero los resultados fueron similares (Fig.17).

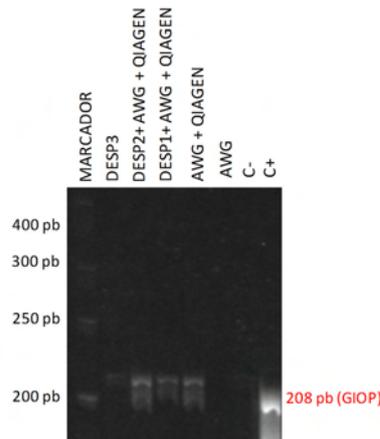


Figura 15: Marcador GIOP (208 pb) usado para la determinación del mejor método de lavado, desparafinación y extracción de ADN, utilizado posteriormente para la detección específica de patógenos a partir de los portaobjetos instalados en los captadores en campo.

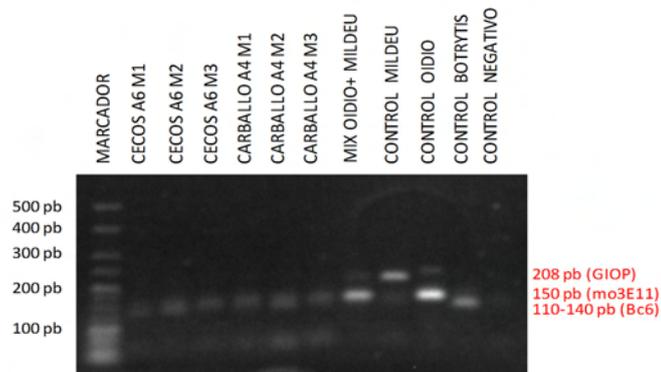


Figura 16: Amplificación en 6 muestras de portaobjetos instalados en los captadores en campo, en los correspondientes controles positivos para Mildiu, Oídio, Botrytis, la mezcla de dos de ellos y un control negativo de los marcadores GIOP, mo3E11 y Bc6.

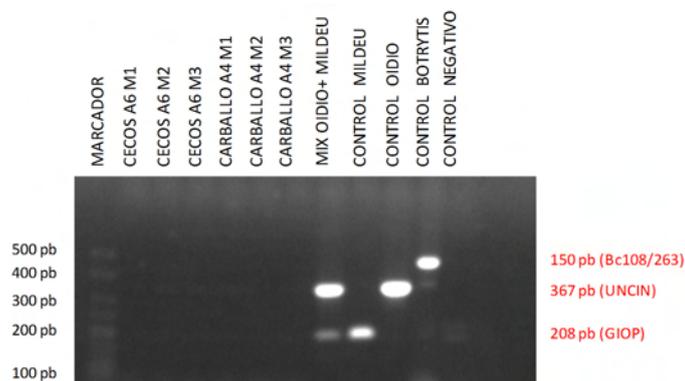


Figura 17: Amplificación en 6 muestras de portaobjetos instalados en los captadores en campo, en los correspondientes controles positivos para Mildiu, Oídio, Botrytis, la mezcla de dos de ellos y un control negativo de los marcadores GIOP, UNCIN y Bc108/263.

4. DISCUSIÓN

Es necesario comenzar diciendo que es la primera vez que se aborda un estudio de este tipo en la zona vitícola asturiana, lo que significa que no contamos con referencias que nos permitan comparar nuestros resultados con los de otros autores, realizados en esta misma zona, y son muy pocos o prácticamente inexistentes los que se han realizado en zonas similares.

En la aparición y desarrollo de las enfermedades fúngicas que atacan a las plantas de vid, son numerosos los factores que influyen. Por un lado, depende de la variedad de vid de que se trate y de otros factores como suelo, clima y manejo de cultivo en los que se encuentre cada una de ellas. Dichos factores influyen por un lado en el desarrollo de la planta a lo largo del ciclo vegetativo y por tanto en su crecimiento y estado de desarrollo cuando se dan las condiciones óptimas de ataque por parte del hongo. A la vez, estos mismos factores influyen también en el desarrollo y multiplicación del hongo y por tanto en su capacidad para infectar los tejidos de las distintas variedades de vid. La viticultura de montaña como la que nos ocupa, que únicamente representa un 5 % de la viticultura mundial (CERVIM, 2014), se caracteriza por desarrollarse bajo unas condiciones de cultivo y un *terroir* (entendiendo por *terroir* el sentido más amplio del término: conjunto de suelo, clima, variedad de vid, orografía del terreno, manejo de cultivo, etc.) muy singulares y específicos de cada una de ellas. Una de las principales características, de este tipo de viticultura, además de la dificultad de manejo, debido a las complicadas condiciones orográficas en las que se desarrolla (zonas de montaña por encima de los 700 metros de altitud y con fuerte pendiente), es el hecho de que cada parcela, en función de su ubicación, de los accidentes orográficos que la circundan, de su pendiente, de su situación de abrigo con respecto a los vientos, a las precipitaciones, etc., puede presentar un «microclima» específico y muy diferente al de las parcelas que se encuentran en su proximidad. Mientras que en otras zonas vitícolas con importantes extensiones de viñedo situado en grandes llanuras (Castilla y León, Castilla-La Mancha...), de características edafoclimáticas muy similares y uniformes entre sí, se pueden extrapolar fácilmente los resultados de unas áreas a otras, en la viticultura de montaña es necesario realizar estudios exhaustivos y muy laboriosos, para poder obtener resultados fiables.

Todas las zonas vitícolas de montaña existentes en el mundo, se caracterizan por contar con sus propias variedades autóctonas, adaptadas a las condiciones concretas de cada una. Así por ejemplo, en la viticultura de montaña de Austria se cultiva la variedad Grüner Veltliner, en Suiza la Petite Arvine o en Asturias el Albarín Blanco (Galet, 2000; Martínez y Pérez, 2000), que además muestran diferentes niveles de sensibilidad a los distintos patógenos que atacan a la vid.

Es evidente por tanto, la importancia que la realización de este tipo de estudios tiene para una zona vitícola como la que nos ocupa, sobre todo si se quiere llevar a cabo un cultivo integrado y con el máximo respeto por el medio ambiente.

Uno de los factores que más influyen en la incidencia de las distintas enfermedades fúngicas en un viñedo, es la concentración de esporas en el aire, además de las condiciones climáticas de cada zona, en los distintos momentos del ciclo vegetativo.

En el presente trabajo se ha abordado un estudio en dos subzonas del área vitícola asturiana. Una de ellas situada en el concejo de Ibias y otra en el concejo de Cangas del

Narcea. Aunque ambas presentan características climáticas similares entre sí, y muy diferentes con respecto a otras áreas limítrofes (Bierzo en el norte de Castilla y León, Rías Baixas en la costa gallega), también parecen presentar diferencias entre ellas. De hecho, y aunque hasta el momento no se disponía de datos científicos que lo acreditaran, existe la creencia entre los viticultores asturianos, de que las zonas vitícolas de Ibias (Cecos) y Cangas del Narcea (Carballo), son muy diferentes entre sí en cuanto a condiciones de maduración de la uva e incidencia a enfermedades fúngicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos han permitido demostrar que en las dos zonas vitícolas analizadas, *P. viticola* fue el patógeno que presentó la mayor concentración de esporas en el aire, siendo Ibias (Cecos) la zona que presentó las concentraciones más elevadas, dato que se corresponde con una importante infección en campo. En los primeros muestreos realizados en esta zona vitícola no se observaron síntomas de Mildiu hasta después del cuajado de la uva (Muestreo 3), y a partir de aquí se observaron síntomas en hojas y racimos, sobre todo en el Verdejo Negro, variedad situada al lado del captador A. En Cangas del Narcea (Carballo) aunque se comprobó que había esporas en el aire, no aparecieron síntomas en la planta.

El segundo patógeno con mayor concentración en aire fue el hongo responsable de la Botrytis (*B. cinerea*), observándose la mayor concentración en Cangas del Narcea (Carballo), donde también se observaron los mayores ataques en hoja en las variedades Albarín Blanco y Verdejo Negro. *E. necator* (hongo responsable del Oídio), fue el que presentó las concentraciones más bajas en ambas zonas, aunque entre los dos emplazamientos, fue Ibias (Cecos) la zona con mayor concentración de esporas de este hongo.

Los daños ocasionados por estas tres enfermedades en las variedades autóctonas Albarín Blanco y Verdejo Negro, en el año de estudio, fueron bajos en comparación con lo observado en años anteriores (Com. Pers., Martínez *et al.*, datos sin publicar).

Otro de los resultados destacados es el hecho de que para Botrytis y Oídio hubo presencia de esporas en el aire en todos los muestreos realizados, aunque en algunos de ellos las concentraciones de estas eran mucho más elevadas que en otros. En el caso de la Botrytis el pico más elevado se produjo en la floración, durante la primavera, en Ibias (Cecos) y Cangas del Narcea (Carballo) y en la maduración, a finales del verano, en Cangas del Narcea (Carballo). En el caso del Oídio, la concentración más alta se produjo entre la floración y cuajado. Para Mildiu sin embargo, en los primeros muestreos no se observó presencia de esporas en el aire en ninguna de las dos zonas vitícolas, aunque aparecieron en los siguientes muestreos.

Tal y como esperábamos, el hecho de que exista una elevada concentración de esporas de un determinado hongo en el aire, no implica necesariamente que se vaya a producir un fuerte ataque en la planta. Para ello tienen que producirse unas condiciones climáticas que favorezcan el desarrollo y multiplicación del hongo y su entrada en la planta a través de los diferentes tejidos de sus órganos verdes. Estas condiciones son diferentes para cada uno de los tres tipos de hongos estudiados. No todos los parámetros climáticos tienen igual influencia en el desarrollo de los hongos, ni los rangos óptimos de cada uno de ellos son los mismos, tal y como han demostrado los resultados obtenidos. Así por ejemplo en el caso de la Botrytis, la lluvia no tuvo mucha influencia en la presencia de síntomas en racimo, pero sí el punto de rocío, sobre todo en los Muestreos 2 y 3 en Ibias (Cecos) y en el Muestreo 5 en Cangas del Narcea (Carballo). En el caso del Mildiu, en los primeros muestreos, no se produjeron grandes

ataques en las cepas, ni se observaron grandes concentraciones de *P. viticola* en el aire, debido a que las temperaturas fueron demasiado bajas al inicio del ciclo vegetativo, frenando la multiplicación y propagación del hongo y limitando así el desarrollo de este en la planta.

Los resultados obtenidos nos han permitido comprobar, tal y como esperábamos para esta zona de viticultura de montaña, que dentro de un mismo viñedo hay una gran diferencia en la concentración de esporas de los distintos hongos, en las capas más altas del aire que en las más bajas. Este aspecto deberá ser estudiado con mayor profundidad, analizando por ejemplo su relación con la orografía de cada una de las parcelas, la dirección predominante de los vientos y otros factores. Es sin duda un resultado importante, ya que de confirmarse la presencia de mayores concentraciones de esporas en las capas más elevadas del aire, sería un factor a considerar en el caso de querer introducir sistemas de conducción y poda más elevados, puesto que aumentaría el riesgo de incidencia a estas enfermedades.

Además de las observaciones y conteos realizados sobre los portaobjetos instalados en los captadores, se realizaron análisis moleculares de identificación de los distintos patógenos, a través de una PCR Multiplex, tal y como se describe en el capítulo de Material y métodos. El objetivo de su utilización era, además de confirmar molecularmente los conteos visuales, poner a punto un sistema de detección rápido, de la presencia de patógenos en campo, lo que permitiría a su vez el establecimiento de sistemas de alarma, incluso antes de que se produjese la aparición de los primeros síntomas en las partes verdes de la planta. Aunque los conteos de esporas al microscopio proporcionan la información necesaria sobre la concentración de esporas en el aire, son muy lentos. Requieren horas de observación paciente y laboriosa de un número elevado de portaobjetos, lo que hace difícil adelantarse a la aparición de los primeros síntomas en las cepas.

Sin embargo, los protocolos de análisis moleculares propuestos por otros autores (Huerga *et al.*, 2014) y utilizados en este trabajo, han resultado poco resolutivos. Aunque no hemos sido capaces de determinar cuáles son los factores que están impidiendo la obtención de los resultados esperados, pensamos que podría ser debido a interferencias producidas por restos de tratamientos fitosanitarios utilizados en el viñedo, que pudieron llegar a los captadores de forma accidental. Dichos tratamientos incluyen en su formulación azufre, cobre y otros productos que según Huerga *et al.* (2014) son potentes inhibidores de la técnica en cuestión. Otro de los factores que podría estar interfiriendo, es la presencia de parafina, que tal y como se explica en el capítulo de Material y métodos, se utiliza para que las esporas del aire queden adheridas al portaobjetos colocado en el captador. Sin embargo, aunque se utilizaron diferentes modificaciones del método empleado, para intentar reducir o minimizar el efecto de estos factores, como una serie de lavados repetidos para eliminar los posibles restos de fitosanitarios o para eliminar la parafina, no fue posible mejorar el resultado.

A la vista de lo expuesto, queda patente la necesidad de continuar los estudios iniciados en el presente trabajo y su interés para el sector vitivinícola asturiano.

5. CONCLUSIONES

- Se ha observado diferencia entre las dos zonas vitícolas objeto de estudio, en cuanto a la concentración de esporas presentes en el aire. En el concejo de Ibias (Cecos) apareció una mayor concentración de *P. viticola* y *E. necator* y en Cangas del Narcea (Carballo) de *B. cinerea*.
- *Plasmopara viticola* fue el patógeno que presentó la mayor concentración de esporas en el aire, seguido de *Botrytis cinerea* y *Erysiphe necator*.
- La presencia de altas concentraciones de esporas en el aire no implica la aparición de síntomas en las plantas de vid, si no se producen las condiciones climáticas óptimas para el desarrollo y multiplicación del hongo.
- En las capas más altas del aire, hay en general una mayor concentración de esporas de los diferentes hongos, lo que puede aumentar el riesgo de ataque en conducciones altas de la vegetación.
- La técnica de análisis molecular PCR Multiplex empleada (Huerga *et al.*, 2014) fue poco resolutiva y será necesario continuar profundizando en los factores que impiden su buen funcionamiento.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATI A; PIVA A; CASTELLARI M; ARFELLI G, «Preliminary studies on the effect of *Oidium tuckeri* on the phenolic composition of grapes and wines». *Vitis*, 1996, **35** (3): 149-150, ISSN 0042-7500.
- BAGGIOLINI M, «Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique». *Revue romande d'agriculture, de viticulture et d'arboriculture*, 1952, **8** (1): 4-6, ISSN 0482-8356.
- BUGIANI R; GOVONI P; CAVANNI P; PONTI I, «Aerobiological network as a part of warning systems for plant protection in Emilia-Romagna (Italy)» in *Proceedings of the First European Symposium on Aerobiology*. Santiago de Compostela, Xunta de Galicia, 1996.
- CAFFI T; ROSSI V; BUGIANI R; SPANNA F; FLAMINI L; COSSU A; NIGRO C, «A model predicting primary infections of *Plasmopara viticola* in different grapevine growing areas of Italy». *Journal of Plant Pathology*, 2009, **91** (3): 535-548, ISSN 1125-4653.
- CALONNEC A; CARTOLARO P; NAULIN JM; BAILEY D; LANGLAIS M, «A host-pathogen simulation model: powdery mildew of grapevine». *Plant Pathology*, 2008, **57** (3): 493-508, ISSN 0032-0862.
- CARISSE O; BACON R; LEFEBVRE A, «Grape powdery mildew (*Erysiphe necator*) risk assessment based on airborne conidium concentration». *Crop Protection*, 2009, **28** (12): 1036-1044, ISSN 0261-2194.
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN, ESTUDIO, SALVAGUARDA, COORDINACIÓN Y VALORIZACIÓN DE LA VITICULTURA DE MONTAÑA, «Presentación», 2014. [Consulta: 13 jul. 2014]. Disponible en: < <http://www.cervim.org/es/cervim-presentaci-n.aspx> >.
- CHEN BT; KESWANI J; ZHOU G; ONG T, «Using PCR to detect indoor fungi», in LEVING H (Ed.), *Proceedings of the 9th international conference on indoor air quality in climate*. California, The International Academy of Indoor Air Sciences, 2002.
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, «Viticultura-Misión Biológica», 2014. [Consulta: 13 jul. 2014]. Disponible en: < <http://www.mbg.csic.es/vitis/> >.
- DÍEZ-NAVAJAS AM; ORTIZ-BARREDO A, «Downy and powdery mildew spore monitoring in Rioja Alavesa vineyards, in the Northwest of Spain» in CALONNEC A; DELMOTTE F; EMMETT B; GADOURY D; GESSLER C; GUBLER D; KASSEMAYER HH; MAGAREY P; RAYNAL M; SEEM R (Eds.), *Proceedings of the 6th international workshop grapevine downy and powdery mildew*. Bordeaux, Institut National de la Recherche Agronomique, 2010, ISBN 978-2-7380-1279-1.
- FALACY JS; GROVE GG; MAHAFFEE WF; GALLOWAY H; GLAWÉ DA; LARSEN RC; VANDERMARK GJ, «Detection of *Erysiphe necator* in air samples using the polymerase chain reaction and species-specific primers». *Phytopathology*, 2007, **97** (10), 1290-1297, ISSN 0031-949X.
- FOURNIER E; GIRAUD T; LOISEAU A; VAUTRIN D; ESTOUP A; SOLIGNAC M; CORNUET JM; BRYGOO Y, «Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota)». *Molecular Ecology Notes*, 2002, **2** (3): 253-255, ISSN 1471-8278.

- GALET P, *Précis de pathologie viticole*, 7^e éd. Montpellier, Imp. JF, 2000, ISBN 978-2902771103.
- GADOURY DM; SEEM RC; FICKE A; WILCOX WF, «The epidemiology of powdery mildew on concord grapes». *Phytopathology*, 2001a, **91** (10): 948-955, ISSN 0031-949X.
- GADOURY DM; SEEM RC; PEARSON RC; WILCOX WF; DUNST RM, «Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of concord grapes». *Plant Disease*, 2001b, **85** (2): 137-140, ISSN 0191-2917.
- GUBLER WD; RADEMACHER M; VASQUEZ SJ; THOMAS CS, «Control of powdery mildew using the UC Davis powdery mildew risk index». *American Phytopathological Society Website*, 1999, [Consulta: 13 jul. 2014]. Disponible en: <<https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/UCDavisRisk.aspx>>.
- HAUGLAND RA; BRINKMAN N; VESPER SJ, «Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis». *Journal of Microbiological Methods*, 2002, **50** (3): 319-323, ISSN 0167-7012.
- HUERGA V; SALAS B; ORTIZ-BARREDO A; DíEZ-NAVAJAS AM, «Inhibitor-free multiplex PCR for the simultaneous detection of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* spores in environmental samples» in DíEZ-NAVAJAS AM; ORTIZ-BARREDO A; MENÉNDEZ C; EMMETT R; GADOURY D; GUBLER WD; KASSEMAYER HH; MAGAREY PA; SEEM R (Eds.), *Proceedings of the 7th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*. Vitoria-Gasteiz, Diputación Foral de Álava, 2014, ISBN 978-84-7821-827-1.
- JARVIS WR; GUBLER WD; GROVE GG, «Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems» in BELANGER RR; BUSHNELL WR; DIK AJ; CARVER TLW (Eds.), *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society, 2002, 169-199, ISBN 0890542910.
- MAGAREY PA; WACHTEL MF; WEIR PC; SEEM RC, «A computer-based simulator for rational management of grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*)». *Plant Protection Quarterly*, 1991, **6** (1): 29-33.
- MARTÍNEZ MC; PÉREZ JE, «The forgotten vineyard of the Asturias Principedom (north of Spain) and ampelographic description of its cultivars (*Vitis vinifera* L.)». *American Journal of Enology and Viticulture*, 2000, **51** (4): 370-378, ISSN 0002-9254.
- MARTINEZ MC; GAGO P; BOSO S; ALONSO VILLAYERDE V; SANTIAGO JL, «Recuperación de la viticultura heroica asturiana». *Enoviticultura*, 2013, (21): 7-12. ISSN 2013-6099.
- MEZA G; ULLOA JC; URIBE AM; GUTIÉRREZ MF, «Unconventional technique of DNA extraction from paraffin embedded tissue for use in the Polymerase Chain Reaction». *Revista U.D.C.A.*, 2013, **16** (1): 35-41, ISSN 0123-4226.
- MONTESINOS E; MORAGREGA C; LLORENTE I; VILARDELL P; BONATERRA A; PONTI I; BUGIANI R; CAVANNI P; BRUNELLI A, «Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration». *Phytopathology*, 1995, **85** (5): 586-592, ISSN 0031-949X.
- PEARSON RC; GÄRTEL W, «Occurrence of hyphae of *Uncinula necator* in buds of grapevine». *Plant Disease*, 1985, **69** (2): 149-151, ISSN 0191-2917.

- PEARSON RC; GADOURY DM, «Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York». *Phytopathology*, 1987, **77** (11): 1509-1514, ISSN 0031-949X.
- PEARSON RC; GOHEEN AC, *Plagas y enfermedades de la vid*. Madrid, Mundi-Prensa, 1996, ISBN 81-7114-607-4.
- PÉREZ MARÍN JL, *Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada*. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1998, ISBN 84-7114-698-3.
- PÉROS JP; MICHEL-ROMITI C; TROULET C; NOTTEGHEM JL, «New rapid PCR protocols to distinguish genetic groups in *Erysiphe necator*». *Vitis*, 2006, **45** (1): 47-48, ISSN 0042-7500.
- RIGOTTI S; VIRET O; KATIA G, «Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr». *Phytopathologia Mediterranea*, 2006, **45** (3): 253-260, ISSN 1593-2095.
- RUMBOLZ J; WIRTZ S; KASSEMAYER HH; GUGGENHEIM R; SCHÄFER E; BÜCHE C, «Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and light regulation». *Plant Biology*, 2002, **4** (3): 413-422, ISSN 1438-8677.
- STEEL RGP; TORRIE JH, *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*, 2nd ed. Tokio, 1980, McGraw & Hill, ISBN 9780070609266.
- VALSESIA G; GOBBIN D; PATOCCHI A; VECCHIONE A; PERTOT I; GESSLER C, «Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction». *Phytopathology*, 2005, **95** (6): 672-678, ISSN 0031-949X.
- YPEMA HL; GUBLER WD, «The distribution of early season grapevine shoots infected by *Uncinula necator* from year to year: a case study in two California vineyards». *American Journal of Enology and Viticulture*, 2000, **51** (1): 1-6, ISSN 0002-9254.