<u>ENTREGABLE E.1.1</u> Protocolos para la inoculación de *Botrytis cinerea* en plántula de vid y racimos de uva, y evaluación de la severidad de la infección.

1.1. Obtención de inóculo de *Botrytis cinerea*

Se seleccionaron cuatro aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos de vid (GIHF-268, GIHf-320, GIHF-377 y GIHF-378).

En primer lugar, se prepararon cultivos monospóricos para garantizar la uniformidad genética de los mismos. Para ello, éstos se hicieron crecer en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25 °C durante 15 días para la producción de esporas. El siguiente paso fue utilizar la metodología de las diluciones sucesivas para obtener cultivos monospóricos de los aislados que se hicieron crecer a 25°C en oscuridad durante 7-10 días.

La caracterización molecular de estos aislados se realizó mediante extracción de ADN de las colonias fúngicas y secuenciación de las regiones ITS (White et al., 1990) y MS547 para diferenciar entre *B. cinerea* y *B. pseudocinerea* (Walker et al., 2011). Además, se realizó la caracterización de los aislados con la metodología de Plesken et al. (2021) que permite distinguir posibles variantes en *B. cinerea*.

Los aislados se conservaron a -80ºC en la colección del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València, para ser utilizados en todos los experimentos del Proyecto.

1.2. Optimización del protocolo de inoculación

Para las inoculaciones se seleccionaron las variedades Tempranillo y Bobal.

Para la inoculación se utilizaron pequeñas plantas de vid obtenidas a partir de semillas. Para ello, en otoño se recogieron racimos maduros de las variedades indicadas y se obtuvieron sus semillas. Éstas se lavaron cuidadosamente, se secaron y se guardaron en condiciones de baja temperatura (4-5 ºC) durante al menos 2 meses. Para la producción de plantas, las semillas se escarificaron sumergiéndolas durante un minuto en una solución de ácido sulfúrico al 10%. Luego se sembraron en vermiculita húmeda para establecer el semillero, incubándose en una

cámara de cultivo a 23 ºC y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A partir de este semillero se obtuvieron plántulas de 3-4 hojas verdaderas que se utilizaron para la inoculación (Figura 1A).

La inoculación se realizó con dos protocolos diferentes:

A/ En las hojas de la vid se realizaron pequeñas lesiones mediante punción con una lanceta metálica de laboratorio. Sobre estas heridas se depositaron gotas de 30 de una suspensión de esporas de *B. cinerea* cuya concentración se ajustó a 10^6 esporas/mL y la planta se embolsó durante 48h para garantizar condiciones de alta humedad, para favorecer el éxito de la infección y el desarrollo de síntomas.

B/ En las hojas de la vid se realizó una lesión superficial de aproximadamente 6 mm de diámetro mediante abrasión durante 10-15 segundos con carborundum. En esta herida se depositó un disco de agar con micelio de *B. cinerea* y la planta se embolsó durante 48h para garantizar condiciones de alta humedad, para favorecer el éxito de la infección y el desarrollo de síntomas.

El protocolo que proporcionó los mejores resultados fue el B (Figura 1B), que se seleccionó para los experimentos de inoculación en plantas y también se va a aplicar a hojas de plantas de vid injertadas que se harán crecer en maceta en condiciones de invernadero.

Figura 1: A/ Plantas de vid Bobal, obtenidas de semilla; B/ lesión foliar causada por *Botrytis cinerea* en una plata de la variedad Tempranillo.

1.3. Validación de la eficiencia de inoculación y niveles de infección

Para validar la eficiencia de inoculación y comprobar los niveles de infección se puso a punto una PCR a tiempo real con sondas TaqMAN desarrollada por Suarez *et. al* 2005. El método incorpora la detección de un gen de la planta huésped (ITS ribosomal) para compensar las variaciones en la eficiencia de extracción y el tamaño de la muestra analizada. Los ensayos diseñados se han utilizado para seguir la progresión de la infección de *B. cinerea* en material vegetal inoculado.

Las plantas analizadas fueron las siguientes:

Código	nº tapa	descripción
V-T1L1	46	24h local planta 1
V-T1L2	47	24h local planta 2
V-T1L3	48	24h local planta 3
V-T1L4	49	24h local planta 4
V-T1L5	50	24h local planta 5
V-T1L6	51	24h local planta 6
V-T1L7	52	24h local planta 7
V-T1L8	53	24h local planta 8
V-T2L9	106	48h local planta 9
V-T2L10	107	48h local planta 10
V-T2L11	108	48h local planta 11
V-T2L12	109	48h local planta 12
V-T2L13	110	48h local planta 13
V-T2L14	111	48h local planta 14
V-T2L15	112	48h local planta 15
V-T2L16	113	48h local planta 16

Para las extracciones de ADN del tejido vegetal infectado se partió de 100 mg de tejido vegetal homogeneizado con nitrógeno líquido y se utilizó el Kit RSC Plant DNA Kit (Promega) en la plataforma de extracción automatizada Maxwell® (Promega). La cantidad y calidad de ADN se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

Para el desarrollo de la PCR a tiempo real se utilizaron los cebadores Bc3 y Bc3R con sonda Bc3P (marcada con FAM) y ITSF y ITSR con sonda TSP (marcada con VIC) (Suarez et. al 2005). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en la plataforma QuantStudio 5 (Applied Biosystems) utilizando GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega).

La cuantificación relativa se realizó utilizando la técnica de la curva estándar. Para las curvas estándar, se realizaron reacciones en triplicado utilizando 2 µl de extractos conocidos de ADN fúngico o vegetal. Las curvas estándar tanto para *B. cinerea* como para el gen normalizador de *Vitis vinifera* se generaron trazando las cantidades de ADN (ng) frente al valor de Cq exportado del sistema de detección de secuencia plataforma QuantStudio 5. Los valores de Cq para las muestras desconocidas se extrapolaron a partir de las curvas estándar y se obtuvieron las cantidades normalizadas de *B. cinerea* dividiendo la cantidad de ADN de *B. cinerea* (ng) por el ADN de la planta (ng) para cada muestra. El error combinado se calculó como: (promedio de ADN de *Botrytis* / promedio de ADN de la planta) × ((DEST de ADN de *Botrytis* / promedio de ADN de *Botrytis*) + (DEST de ADN de la planta / promedio de ADN de la planta)).

Tal y como se puede observar en la Tabla 1 y Figura 2, donde muestran los resultados obtenidos, en todas las muestras se detectó *B. cinerea* siendo mayor el nivel de infección a las 48h. Estos datos validan la eficiencia del protocolo de inoculación desarrollado en este trabajo.

Tabla 1: Ciclos de cuantificación de detección de *Botrytis cinera* y el gen *ITS ribosomal* de *Vitis vinifera* en muestras de plantas inoculadas.

24H	Cq Botrytis	desvt	Cq Planta (ITS ribosomal)	desvt
V-T1L1 46	**29,91**	0,335	**20,90**	0,074539
V-T1L2 47	**24,73**	0,036	**22,01**	0,052729
V-T1L3 48	**28,33**	0,042	**22,10**	0,024542
V-T1L4 49	**27,32**	0,211	**20,39**	0,120525
V-T1L5 50	**26,60**	0,126	**22,06**	0,064609
V-T1L6 51	**24,88**	0,152	**21,75**	0,618627
V-T1L7 52	**25,86**	0,252	**21,96**	0,061392
V-T1L8 53	**25,82**	0,198	**21,10**	0,136544
48H	**Cq Botrytis**	**desvt**	**Cq Planta (ITS ribosomal)**	**desvt**
V-T2 L9 106	**24,12**	0,098	**21,44**	0,10949
V-T2 L10 107	**22,63**	0,140	**20,81**	0,033201
V-T2 L11 108	**22,97**	0,367	**21,17**	0,186859
V-T2 L12 109	**27,95**	0,024	**22,44**	0,099082
V-T2 L13 110	**22,64**	0,103	**21,19**	0,020809
V-T2 L14 111	**21,69**	0,169	**20,73**	0,205452
V-T2 L15 112	**24,56**	0,159	**22,61**	0,051215
V-T2 L16 113	**20,11**	0,104	**19,27**	0,116723

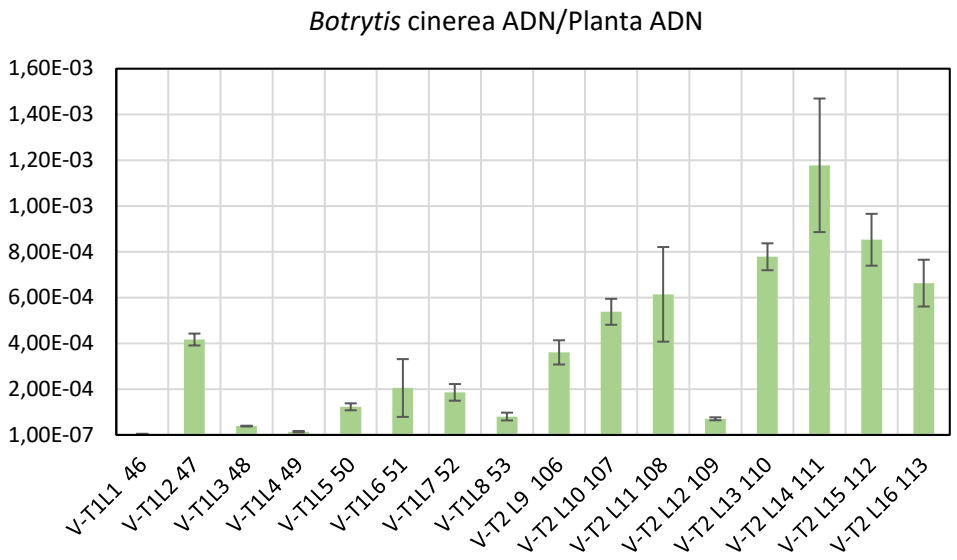

Figura 2: Cuantificación relativa ADN *B. cinerea* respecto a ADN de planta.

Referencias

Plesken, C., Pattar, P., Reiss, B., Noor, Z. N., Zhang, L., Klug, K., HUettel, B., Hahn, M. (2021). Genetic diversity of *Botrytis cinerea* revealed by multilocus sequencing, and identification of *B.*

cinerea populations showing genetic isolation and distinct host adaptation. Frontiers in Plant Science, 12, 663027.

Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., Barker, I. Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. Plant Physiol Biochem. 2005 Sep;43(9):890-9. doi: 10.1016/j.plaphy.2005.07.003. Epub 2005 Aug 18. PMID: 16198585.

Walker, A. S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 101(12): 1433-1445.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315-322.