

# PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot

## Detección por PCR de *Guignardia bidwellii*, agente causal de la pudrición negra de la vid

Magnolia Moreno-Velázquez, Lervin Hernández-Ramos\*, Ana Karen Preuss-Angeles, Liliana Elizabeth Ronces-Frutos, Israel Morales-González, Nayeli Carrillo-Ortiz, Antonio Cárcamo-Rodríguez. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA SAGARPA, Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac Estado de México C. P. 55740. \*Autor para correspondencia: lervin.hernandez@senasica.gob.mx

Recibido: 31 de Mayo, 2019.

Aceptado: 28 de Julio, 2019.

Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Preuss-Angeles AK, Ronces-Frutos LE, Morales-González I, Carrillo-Ortiz N and Cárcamo-Rodríguez A. 2019. PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 383-398.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-5

Primera publicación DOI: 14 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 14, 2019.

**Resumen.** *Guignardia bidwellii* (anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*) es el agente etiológico de la pudrición negra de la vid, enfermedad de importancia económica en Europa y cuarentenaria para México. La identificación del estado anamorfo mediante caracteres morfológicos resulta complicada debido a la similitud entre especies del mismo género, por ejemplo, con el endófito cosmopolita *G. endophyllicola* (*P. capitalensis*), por lo que es necesario contar con herramientas de diagnóstico rápidas y específicas. Con este propósito se desarrolló un marcador molecular basado en los polimorfismos

**Abstract.** *Guignardia bidwellii* (anamorph *Phyllosticta ampellicida*) is the etiological agent of grape black rot, a disease of economic importance in Europe and a quarantine pest for Mexico. The identification of the anamorphic state by morphological characteristics is complicated, due to the similarity among species of the same genus, for example with the cosmopolitan endophyte *G. endophyllicola* (*P. capitalensis*), therefore it is necessary to have quick and specific diagnostic tools. For this purpose, a molecular marker based on single nucleotide polymorphisms (SNP) in the ITS region of the rDNA was developed, where the Bidwell and Ampel2 primers were designed. The PCR amplification generates a fragment of 173 bp, specific to *G. bidwellii* f. *euvitis*. The validation of the method showed that there is no cross amplification with closely related phytopathogenic fungi or with the genome of grapevine. The technique was sensitive to detect up to 30 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA from monosporic cultures and in mixture of plant tissue. This diagnostic procedure is presented as a fast and specific option for the monitoring, and detection

de un solo nucleótido (SNP) en la región ITS del ADN<sub>r</sub>, donde se diseñaron los oligos Bidwell y Ampel2 que mediante amplificación PCR generan un fragmento de 173 pb específico a *G. bidwellii f. euvitis*. La validación del método demostró que no hay amplificación cruzada con otros hongos fitopatógenos ni con el genoma de la vid. La técnica fue sensible al detectar hasta 30 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN a partir de cultivos monospóricos y en mezcla con tejido vegetal. Se presenta este procedimiento de diagnóstico como una opción rápida y específica para el monitoreo y detección de *G. bidwellii f. euvitis* en apoyo a las estrategias de prevención, manejo, cuarentena y erradicación de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Phyllosticta ampellicida*, diagnóstico molecular, ITS, *Vitis* spp.

El hongo fitopatógeno *Guignardia bidwellii* (anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*) es el agente causal de la pudrición negra de la vid, una de las enfermedades más importantes de la viticultura en Europa (Ullrich *et al.*, 2009). Es nativo de Norteamérica y fue introducido a Europa a partir de la movilización de híbridos infectados a finales del siglo XIX (Wicht *et al.*, 2012). El patógeno se encuentra distribuido en importantes zonas vitícolas como Francia, Alemania y norte de Italia, lo que representa un potencial riesgo fitosanitario en aquellas regiones donde la humedad relativa es alta durante el verano, que se traduce en pérdidas económicas considerables si no se realiza un manejo adecuado de la enfermedad (Wicht *et al.*, 2014).

La pudrición negra afecta principalmente a la vid (*Vitis* spp.), pero también se presenta en otros hospedantes de la familia Vitaceae: *Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp., *Cissus* spp. (Van der Aa, 1973; Wicht *et al.*, 2012). Se han observado diferencias de susceptibilidad entre diversos cultivares,

de *G. bidwellii f. euvitis* in support of prevention, management, quarantine and eradication strategies of the disease.

**Key words:** *Phyllosticta ampellicida*, molecular diagnosis, ITS, *Vitis* spp.

The *Guignardia bidwellii* phytopathogen fungus (anamorph: *Phyllosticta ampellicida*) is the causal agent of grape black rot, one of the most important diseases that affect grape production in Europe (Ullrich *et al.*, 2009). The fungus is native to North America and was introduced into Europe when infected hybrids were mobilized at the end of the XIX century (Wicht *et al.*, 2012). The pathogen is distributed across important grape producing zones such as France, Germany and northern Italy, a fact that poses a potential phytosanitary risk in those regions, where relative humidity is high in the summer and causes considerable economic losses if there are no adequate measures for controlling the disease (Wicht *et al.*, 2014).

Black rot affects mainly grape crops (*Vitis* spp.) but is also present in other hosts of the Vitaceae family: *Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp., *Cissus* spp. (Van der Aa, 1973; Wicht *et al.*, 2012). Differences have been observed among diverse cultivars, but all the commercially important varieties are susceptible to the disease (Ullrich *et al.*, 2009). Luttrell (1946) proposed that the fungus has three variants or *forms* (*f.*) depending on the host (*f. euvitis*, *f. parthenocissi* and *f. muscadinii*). However, molecular studies have demonstrated differentiation only in two different forms: those coming from *Vitis* and *Parthenocissus* hosts (Wicht *et al.*, 2014). Traditional identification of *G. bidwellii* is based on the description of morphological traits and symptoms expression (Wicht *et al.*, 2012), but the anamorphic state has characteristics similar to

sin embargo, todas las variedades de importancia comercial son susceptibles a la enfermedad (Ullrich *et al.*, 2009). Luttrell (1946) propuso que el hongo presenta tres variantes o *formas* (*f.*) en función del hospedante (*f. euvtis*, *f. parthenocissi* y *f. muscadinii*), sin embargo, los estudios moleculares sólo han demostrado la diferenciación en dos formas distintas: las provenientes de los hospedante *Vitis* y *Parthenocissus* (Wicht *et al.*, 2014). La identificación tradicional de *G. bidwellii* se basa en la descripción de los caracteres morfológicos y la expresión de síntomas (Wicht *et al.*, 2012); sin embargo, el estado anamorfo posee características similares con varias especies relacionadas, por ejemplo: picnidios con conidios hialinos sin septos, cubiertos por una capa mucoide y un apéndice apical (Wikee *et al.*, 2013a).

El hongo endófito *Guignardia endophyllicola* (*Phyllosticta capitalensis*) es una especie cosmopolita y un parasito débil en un amplio rango de hospedantes (Okane *et al.*, 2003) que incluye a miembros de la familia Vitaceae (Wikee *et al.*, 2013b). El estado teleomorfo y anamorfo pueden confundirse morfológicamente con *G. bidwellii* y *P. ampelicida*, conduciendo a una incorrecta identificación, por lo que es necesario la corroboración mediante el uso de técnicas moleculares (Wicht *et al.*, 2014).

Existen pocos estudios moleculares sobre *G. bidwellii*. En una primera aproximación, Wicht *et al.*, (2012) analizaron filogenéticamente la región ITS1 e ITS2 de muestras provenientes de diversos orígenes geográficos, concluyendo que existe evidencia de dos variantes asociadas a los hospedantes de los géneros *Vitis* y *Parthenocissus*. Zhang *et al.* (2013) llegaron a una conclusión similar mediante un análisis multilocus de cuatro genes, propusieron recategorizar a esta *forma* a nivel de especie como *P. parthenocissi*. Mientras, el uso de microsatélites ha permitido determinar que existe una gran

several related-species, for example, pycnidia with non-septate, hyaline conidia covered by a mucoid layer, and an apical appendix (Wikee *et al.*, 2013a).

The *Guignardia endophyllicola* (*Phyllosticta capitalensis*) endophyte fungus is a cosmopolitan species and a weak parasite in a wide range of hosts (Okane *et al.*, 2003) which includes members of the Vitaceae family (Wikee *et al.*, 2013b). The teleomorphic and anamorphic states can be morphologically confounded with *G. bidwellii* and *P. ampelicida*, which leads to an incorrect identification, thus being necessary to corroborate the results using molecular techniques (Wicht *et al.*, 2014).

Only a few molecular studies about *G. bidwellii* have been conducted. In a first approximation, Wicht *et al.* (2012) performed a phylogenetic analysis of ITS1 and ITS2 regions of samples from diverse geographical origins and concluded that there was evidence of two variants associated with hosts of the *Vitis* and *Parthenocissus* genera. Zhang *et al.*, (2013) reached a similar conclusion through a multilocus analysis of four genes and proposed to re-categorize this *form* at the level species as *P. parthenocissi*. In the meantime, the use of microsatellites has made possible to determine that there is a great allelic variety in the populations in Europe and between both hosts (Wicht *et al.*, 2014). However, there is not enough evidence to associate a *G. bidwellii* genotype with one specific reaction in the *Vitis* host (Rinaldi *et al.*, 2017).

Currently, grape black rot is an economically important disease in Europe and a quarantine pest for Mexico (SENASICA, 2019), so as part of the scientific support to the epidemiological surveillance programs, it is important to have a protocol based on molecular techniques that allow a correct identification of the species. Therefore, the objective of the present study was to design, develop and validate a molecular marker based on

variación alélica en las poblaciones presentes en Europa y entre ambos hospedantes (Wicht *et al.*, 2014), sin embargo, no existe evidencia suficiente para asociar un genotipo de *G. bidwellii* a una reacción específica en el hospedante *Vitis* (Rinaldi *et al.*, 2017).

En la actualidad la pudrición negra de la vid es una enfermedad de importancia económica en Europa y cuarentenaria para México (SENASICA, 2019), como parte del sustento científico en los programas de vigilancia epidemiológica, es importante contar con un protocolo basado en técnicas moleculares que permita la correcta identificación de la especie, por lo cual el objetivo del presente estudio fue diseñar, desarrollar y validar un marcador molecular basado en la técnica de PCR con oligos específicos para el diagnóstico de *G. bidwellii*.

## MATERIALES Y METODOS

**Obtención de aislamientos.** Se utilizaron las cepas de referencia *Guignardia bidwellii f. euvitis* ATCC 9560 (Georgia, Estados Unidos), *Guignardia endophyllicola* CNRF-MICO-C1/001 (Michoacán) y *Guignardia citricarpa* ATCC 26254 (Sudáfrica), además de aislamientos pertenecientes a la colección de hongos fitopatógenos del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en México, de las especies fitopatógenas *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, así como hojas de vid infectadas con *Plasmopara viticola*.

Los aislamientos de la colección del CNRF-SENASICA se mantienen conservados a 4 °C en aceite mineral de acuerdo a la metodología empleada por Humber (1997), se reactivaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25 °C ± 3 °C durante diez días. A continuación,

the PCR technique using specific oligos to detect *G. bidwellii*.

## MATERIALS AND METHODS

**Obtaining isolates.** For the experiment, *Guignardia bidwellii f. euvitis* ATCC 9560 (Georgia, United States), *Guignardia endophyllicola* CNRF-MICO-C1/001 (Michoacán, Mexico) and *Guignardia citricarpa* ATCC 26254 (South Africa) were used as reference strains, as well as isolates of phytopathogen species *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* from the phytopathogen fungi collection of the National Phytosanitary Reference Center (CNRF, for its acronym in Spanish) of the General Directorate of Plant Health (DGSV, for its acronym in Spanish) in Mexico, and grape leaves infected with *Plasmopara viticola*.

The isolates of the CNRF-SENASICA collection are kept in mineral oil at 4 °C, according to the methodology used by Humber (1997) and were reactivated in a potato-dextrose-agar (PDA) medium and incubated at 25 °C ± 3 °C for 10 days. Then, monosporic cultures, monopycnidial cultures in the case of gender *Guignardia*, were carried out in PDA, based on Crous *et al.*, (2005), and incubated at the previously mentioned temperature under 12/12 hours light-darkness intervals for 15 days. *P. viticola* was preserved in the form of herbarium in a botanical press.

**DNA extraction.** Total genomic DNA was extracted from species of the *Guignardia* genus and from grape tissue, healthy and infected with *P. viticola*, following the method of CTAB (Doyle and Doyle, 1987); for the other four species, DNA was extracted according to the methodology proposed

los cultivos monospóricos, monopicnidiales para el caso del género *Phyllosticta*, se realizaron con base en Crous *et al.* (2005), en PDA y se incubaron a la temperatura mencionada anteriormente bajo 12/12 horas luz-oscuridad durante 15 días. Para *P. viticola* se mantuvo preservado en forma de herbario en prensa botánica.

**Extracción de ADN.** La extracción de ADN genómico total se realizó mediante el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) para las especies del género *Guignardia* y para el tejido de vid sano e infectado con *P. viticola*, mientras que para las cuatro especies restantes se utilizó la metodología propuesta por Ceniz (1992) a partir de placas de PDA, omitiéndose el primer centrifugado. La cantidad y calidad del ADN se verificó por la relación de absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  (Manchester, 1995) en un espectrofotómetro Nanodrop 2000C.

**Diseño de oligos.** *In silico* se utilizaron secuencias de la región ITS del ADNr de 46 especies del género *Guignardia* reportadas por Wikee *et al.*, (2013a), más las secuencias de referencia AB095505, AB095509 a AB095511, AB454268, AB454276, AB454313, HM008727 a HM008728, FJ824766, EU683672, KC193586, KF015253 a KF015268 y KF851288 a KF851317 correspondientes a la *f. euvitis* y *f. parthenocissus* (Okane *et al.*, 2003, Motohashi *et al.*, 2009, Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). Las secuencias se alinearon con el algoritmo ClustalW en BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Se identificaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) característicos de la secuencia consenso de referencia de *G. bidwellii f. euvitis* respecto a las otras 46 especies, la región ITS se utilizó para diseñar el oligonucleótido *forward* Bidwell.

El oligonucleótido *reverse* Ampel2 se diseñó utilizando el software Primer3 (Untergasser *et al.*,

by Ceniz (1992), that is, using PDA plates but omitting the first centrifugation. The amount and quality of DNA was verified through the absorbance relation  $A_{260/280}$  and  $A_{260/230}$  (Manchester, 1995) in a Nanocrop 2000C spectrophotometer.

**Design of oligos.** For *in silico* tests, sequences of ITS regions of rDNA of 46 species of the *Guignardia* genus reported by Wikee *et al.* (2013a) were used, as well as the reference sequences AB095505, AB095509 to AB095511, AB454268, AB454276, AB454313, HM008727 to HM008728, FJ824766, EU683672, KC193586, KF015253 to KF015268 and KF851288 to KF851317 corresponding to *f. euvitis* and *f. parthenocissus* (Okane *et al.*, 2003, Motohashi *et al.*, 2009, Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). The sequences were aligned using the ClustalW algorithm in BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Single nucleotide polymorphisms (SNP) characteristic to *G. bidwellii f. euvitis* consensus reference were identified with respect to the other 46 species, and the ITS region was used to design the *forward* Bidwell oligonucleotide.

The *reverse* Ampel2 oligonucleotide was designed with the Primer3 software (Untergasser *et al.*, 2012) using the same consensus sequence. The pair of oligonucleotides was structured in order to amplify a unique 173 bp fragment. The thermodynamic parameters, the formation of internal structures, the heterodimers and the autodimers were examined *in silico* using mFold (Zuker, 2003). The specificity of both oligonucleotides was tested *in silico* with Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012).

**PCR amplification.** After extraction, a PCR test of the endogenous gene was conducted using ITS1 oligonucleotides (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5'

2012) a partir de la misma secuencia consenso. El par de oligonucleótidos se estructuró para amplificar un fragmento único de 173 pb. Los parámetros termodinámicos, la formación de estructuras internas, heterodímeros y autodímeros se examinaron *in silico* con mFold (Zuker, 2003). La especificidad de ambos oligonucleótidos fue ensayada *in silico* mediante Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012).

**Amplificación por PCR.** Después de la extracción se realizó un ensayo de PCR de gen endógeno con los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) para verificar la calidad del material genético. La amplificación se realizó con el Kit Taq DNA Polymerase de Invitrogen®, la mezcla de reacción se hizo a una concentración final de Buffer 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 µM de cada iniciador, 2.5 U Taq Polymerase y 2 ng µL<sup>-1</sup> de ADN en un volumen de 25 µL. El programa térmico utilizado fue una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, hibridación a 58 °C por 45 s, extensión de 72 °C por 45 s y una extensión final de 72 °C por 10 min. Se utilizó un T100™ Thermal Cycler de BioRad.

La amplificación del fragmento de 173 pb con los oligonucleótidos específicos se realizó usando la misma mezcla de reacción con un programa térmico de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, hibridación a 62 °C por 30 s, extensión de 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X marcado con 1X de GelRed® Biotium. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó utilizando un marcador TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

**Control positivo.** Se generó a partir del fragmento específico del gen amplificado con los

TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) to verify the quality of the genetic material. The amplification was performed with a Taq DNA Polymerase kit from Invitrogen®, the reaction mixture was prepared using a final concentration of Buffer 1X, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 µM of each primer, 2.5 U Taq Polymerase and 2 ng µL<sup>-1</sup> of DNA in a 25 µL volume. The thermal program used was an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 45 s, hybridization at 58 °C for 45 s, an extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 10 min. For this, a T100™ Thermal Cycler from BioRad was used.

The amplification of the 173 bp fragment using the specific oligonucleotides was performed using the same reaction mixture with a thermal program of denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 45 s, hybridization at 62 °C for 30 s, one extension at 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were analyzed in 2% ultra-pure agarose gels in a TAE 1X buffer marked with 1X from GelRed® Biotium. The size of the amplified fragments was estimated using a TrackIt 100 bp DNA Ladder marker from Invitrogen.

**Positive control.** The positive control was obtained using the specific fragment of the amplified gene with Bidwell and Ampel2 oligonucleotides. The PCR product was cloned using pGEM® T Easy Vector from Promega. The plasmid carrying the fragment was used to transform One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> *E. coli* competent cells from Invitrogen. The bacterial colonies that were able to introduce the plasmid were selected and DNA extraction was carried out following the alkaline lysis method (Sambrook and Russell, 2001). Then, the cloned insert was amplified by PCR and sequenced in both directions with an ABI PRISM 3130 sequencer from Applied Biosystems® through BigDye™ Terminator v3.1 chemistry.

oligonucleótidos Bidwell y Ampel2. El producto de PCR se clonó utilizando pGEM® T Easy Vector de Promega. El plásmido portador del fragmento se utilizó para transformar las células competentes One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> *E. coli* de Invitrogen. Se seleccionaron las colonias bacterianas que lograron introducir el plásmido y se realizó extracción de ADN con el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). A continuación, el inserto clonado se amplificó por PCR y se secuenció en ambos sentidos con el equipo ABI PRISM 3130 de Applied Biosystems® mediante la química BigDye™ Terminator v3.1.

Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el algoritmo denominado Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (nucleotide BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) y con las secuencias reportadas por Wicht *et al.*, (2012) y Rinaldi *et al.*, (2017).

**Ensayo de especificidad.** Se evaluó el par de oligonucleótidos contra los hongos *G. bidwellii f. euvitis*, *G. citricarpa*, *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *P. viticola* y *G. endophyllicola*, este último reportado como hongo cosmopolita endófito (Okane *et al.*, 2003) relacionado morfológica y filogenéticamente a *G. bidwellii*. Como control negativo se utilizó ADN de tejido de vid sano y un control blanco (sin ningún tipo de ADN). El ensayo se realizó por duplicado incluyendo cada vez dos repeticiones por espécimen. El resultado se consideró como positivo cuando se obtuvo la amplificación del fragmento de 173 pb.

**Ensayo de sensibilidad.** A partir del control clonado de *G. bidwellii f. euvitis* a una concentración inicial de 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  se realizaron diluciones seriadas para obtener ocho concentraciones de trabajo (3000, 300, 30, 3, 0.3, 0.15, 0.06 y 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Cada dilución se amplificó por triplicado usando

The sequences obtained were compared to sequences in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the algorithm known as Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) and with the sequences reported by Wicht *et al.* (2012) and Rinaldi *et al.* (2017).

**Specificity test.** The pair of oligonucleotides was evaluated against fungi *G. bidwellii f. euvitis*, *G. citricarpa*, *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *P. viticola* and *G. endophyllicola*, from which the latter has been reported as a cosmopolitan fungal endophyte (Okane *et al.*, 2003) morphologically and phylogenetically related to *G. bidwellii*. DNA of healthy grape tissue was used as a negative control, and one blank control (without any type of DNA). The test was conducted by duplicate including two replications per specimen each time. The result was considered positive when a 173 bp amplified fragment was obtained.

**Sensitivity test.** Serial dilutions to obtain eight working concentration (3000, 300, 30, 3, 0.3, 0.15, 0.06 and 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) were prepared using a cloned control of *G. bidwellii f. euvitis* at an initial concentration of 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Each dilution was amplified per triplicate using Bidwell-1 and Ampel-2 oligos under the reaction conditions and the thermal program previously mentioned. Then, a second test was conducted with seven dilutions of the cloned control (1000, 500, 300, 30, 3, 0.3 and 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), two replications per dilution, and 1  $\mu\text{L}$  of DNA extracted from healthy grapes (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) was added to the 25  $\mu\text{L}$  of the final reaction.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design of oligos.** The bioinformatic analysis of the oligonucleotides designed for *G. bidwellii*

los oligos Bidwell-1 y Ampel-2 siguiendo las condiciones de reacción y programa térmico mencionados con anterioridad. A continuación, se realizó un segundo ensayo con siete diluciones del control clonado (1000, 500, 300, 30, 3, 0.3 y 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), dos repeticiones por dilución y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de ADN extraído de vid sana (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) a los 25  $\mu\text{L}$  de la reacción final.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Diseño de oligos.** El análisis bioinformático de los oligonucleótidos diseñados para *G. bidwellii* (Cuadro 1), señala que el valor de  $\Delta G$  fue menor a 2 kcal  $\text{mol}^{-1}$ , lo que indica que no hay formación de estructuras secundarias importantes que afecten negativamente la reacción (Matveeva *et al.*, 2003); En consecuencia los valores de  $\Delta G$  para el extremo 3', autodimeros y heterodimeros estuvieron dentro de los rangos tolerados de acuerdo a Untergasser *et al.* (2012). Otros criterios como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), longitud, % de GC, presencia de C o G en el extremo 3', dinucleótidos en tándem y bases repetidas, estuvieron dentro de los parámetros aceptables de acuerdo a Rychlik (1995).

Respecto a la especificidad, el análisis *in silico* mediante BLAST del oligonucleótido *forward* Bidwell

(Table 1) shows that the value of  $\Delta G$  was less than 2 kcal  $\text{mol}^{-1}$ , which indicates that there was no formation of important secondary structures that negatively affect the reaction (Matveeva *et al.*, 2003). Consequently, the values of  $\Delta G$  for end 3', autodimers and heterodimers were within the tolerated ranges, according to Untergasser *et al.* (2012). Other criteria such as fusion temperature ( $T_m$ ), length, GC %, presence of C or G at end 3', tandem dinucleotides and repeated bases were within acceptable parameters, according to Rychlik (1995).

Regarding specificity, the analysis *in silico* of the *forward* Bidwell oligonucleotide using BLAST showed 100% coverage and identity only with *G. bidwellii* sequences; no other fungus had an homologous region, and the closest organisms were *Streptomyces* sp. and *Bacillus subtilis* with 85% and 76% coverage, respectively. The oligo *reverse* Ampel2 also showed 100% coverage and identity with *G. bidwellii*. However, in this case they were completely homologous to many species of *Guignardia* genus but not to *Streptomyces* and *Bacillus* genera.

A multiple alignment with the reference sequences of Wikee *et al.* (2013a) confirmed that Bidwell is specific, given that the 21 nucleotides of the oligonucleotide are completely homologous

**Cuadro 1. Oligonucleótidos específicos para la detección de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*) mediante PCR punto final.**

**Table 1. Specific oligonucleotides to detect *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*) through end-point PCR.**

Oligo	Secuencia 5'a 3'	pb	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>x</sup>	%GC <sup>x</sup>	$\Delta G$ <sup>y</sup>	Valor de E <sup>z</sup>	% Cobertura <sup>z</sup>	% Identidad <sup>z</sup>
Bidwell	GAAAAGCCGTCGAAAGAGCC	173	66.47	57.14	1.98	0.083	100	100
Ampel2	CAGGACTTCACGAAATAATCG		57.38	42.86	0.84	0.083	100	100

<sup>x</sup> Valores calculados mediante Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) ♦ Values calculated using Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012).

<sup>y</sup> Valor de energía libre de Gibbs calculado con mFOLD (Zuker, 2003) ♦ Value of Gibbs free energy calculated using mFOLD (Zuker, 2003).

<sup>z</sup> Valor de E, cobertura e identidad determinado con nBLAST del NCBI para las accesiones KF851289 a KF851315 ♦ Value of E, coverage and identity determined using nBLAST from NCBI for accessions KF851289 to KF851315.



mostró un 100% de cobertura e identidad sólo con secuencias de *G. bidwellii*, ningún otro hongo presentó una región homóloga, los organismos más cercanos fueron *Streptomyces* sp. y *Bacillus subtilis* con un 85 y 76% de cobertura. Para el oligo *reverse* Ampel2 también hubo 100% de cobertura e identidad con *G. bidwellii*, sin embargo, en este caso hubo homología completa con muchas especies dentro del género *Guignardia*, no así con los géneros *Streptomyces* y *Bacillus*.

El alineamiento múltiple con las secuencias de referencia de Wikee *et al.* (2013a) confirmó que Bidwell es específico, dado que los 21 nucleótidos del oligonucleótido tienen homología completa con las secuencias reportadas en el hospedante *Vitis* (Figura 1a), adicionalmente, los primeros once nucleótidos del extremo 3' de este oligo incluyen a la variante reportada en el hospedante *Parthenocissus* (Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). Por otra parte, Ampel2 se ubica en una región conservada, puesto que los últimos ocho nucleótidos hacia el extremo 3' son constantes para todas las especies del género *Guignardia* (Figura 1b). Ambos resultados fueron acordes a lo observado en BLAST.

**Amplificación y especificidad.** Se obtuvo ADN genómico de buena calidad tanto para los cultivos monospóricos como para las muestras provenientes de tejido vegetal. El ensayo de gen endógeno de la región ITS del ADNr tuvo una amplificación de PCR eficiente que varió entre 550 a 750 pb de acuerdo a cada especie (Figura 2a), lo que indica que el ADN obtenido es apto para ser amplificado, esta íntegro y no existe inhibición proteica de la reacción.

La reacción de PCR con el par de oligonucleótidos específicos Bidwell y Ampel2 generó el fragmento esperado de 173 pb sólo para el ADN de *G. bidwellii* (Figura 2b). Los oligonucleótidos

to the sequences reported for the *Vitis* host (Figure 1a). Additionally, the first 11 nucleotides of the oligo end 3' include the variant reported for the *Parthenocissus* host (Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). On the other hand, Ampel2 is located in a conserved region, since the last eight nucleotides towards end 3' are constant to all the species of the *Guignardia* genus (Figure 1b). Both results were in agreement with what we observed in BLAST.

**Amplification and specificity.** Genomic DNA of good quality was obtained both for monosporic cultures and for samples from vegetal tissue. The test of the endogenous genes of the ITS region of rDNA had an efficient PCR amplification ranging from 550 to 750 bp according to each species (Figure 2a), which indicates that the DNA obtained is suitable for amplification, is whole and there is no protein inhibition of the reaction.

The PCR reaction with the pair of specific oligonucleotides Bidwell and Ampel2 produced the expected 173 bp fragment only for *G. bidwellii* DNA (Figure 2b). The oligonucleotides did not show any cross reaction with any other fungus, including *G. endophyllicola*, which is the most related species at the molecular level. No reaction was either observed in grape tissue, so the plant's genome does not produce false positives. Oligonucleotides specificity was also confirmed through sequencing of the PCR products that were positive in the test, obtaining a 100% coverage and identity with *G. bidwellii* accessions KF015253 to KF015255, according to Rinaldi *et al.* (2017).

**Sensitivity test.** The amplification of the cloned fragment was inhibited when a concentration of 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  was used, so in a second test a concentration of 1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  was used, where the band was dim or imperceptible. All the other

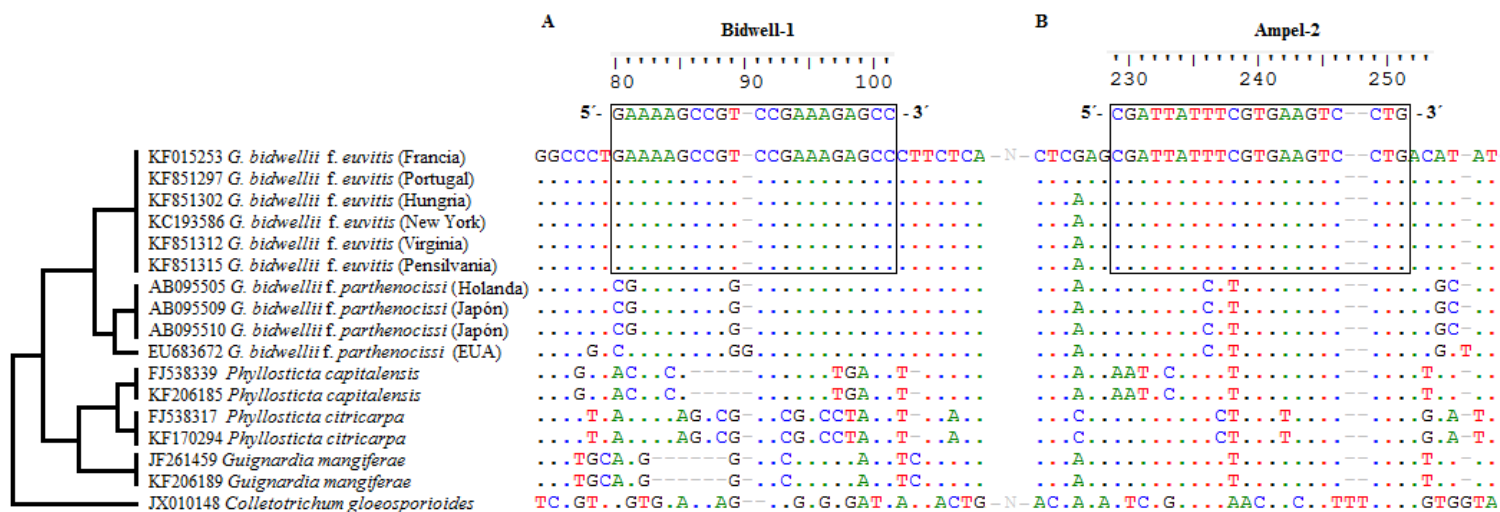


Figura 1. Filogenia de la región ITS del ADNr para las secuencias representativas de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* y f. *parthenocissi*. A) Alineamiento de las secuencias para diseñar el forward Bidwell-1. B) Diseño en sentido 5'-3' del reverse Ampel-2. Se utilizó a *C. gloeosporioides* como nodo raíz externo al grupo.

Figure 1. Phylogeny of the ITS region of rDNA for the representative *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* and f. *parthenocissi* sequences. A) Alignment of the sequences to design forward Bidwell-1. B) Design in direction 5'-3' of reverse Ampel-2. *C. gloeosporioides* was used as a root node external to the group.

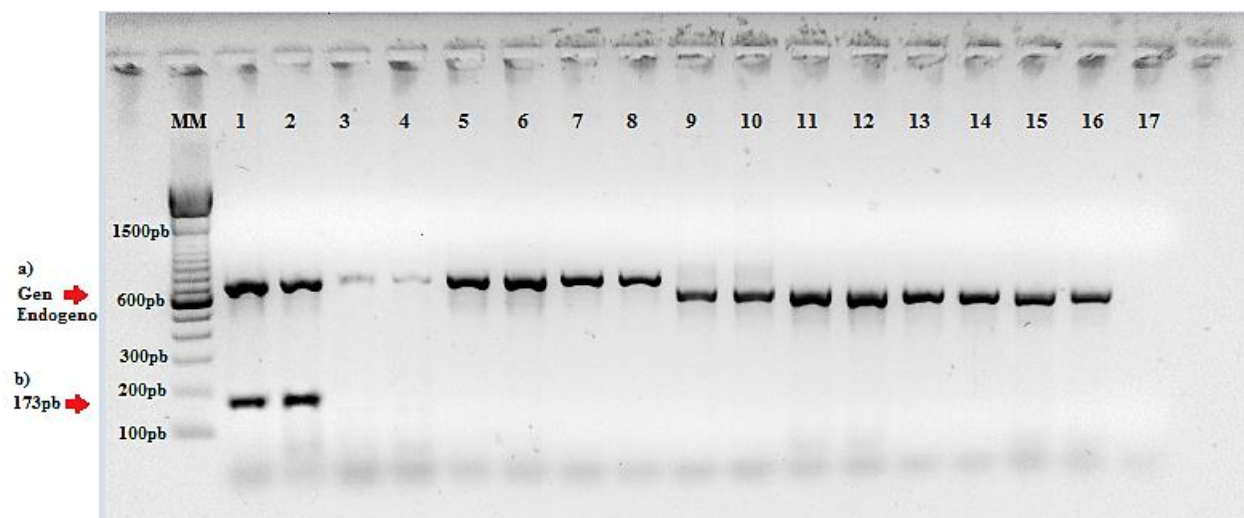


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR. A) Ensayo de gen endógeno con los oligos ITS-1 e ITS-4 (550-750 pb). B) Ensayo con los oligos específicos Bidwell-1 y Ampel-2 (173 pb). Para ambos ensayos carril 1-2: *G. bidwellii*, 3-4: ADN de vid con *Plasmopara viticola*, 5-6: *G. endophyllicola*, 7-8: *G. citricarpa*, 9-10: *Verticillium dahliae*, 11-12: *F. oxysporum*, 13-14: *A. alternata*, 15-16: *C. gloeosporioides*, 17: Blanco con H<sub>2</sub>O. MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

Figure 2. Amplification of the PCR products. A) Test of the endogenous gene with oligos ITS-1 and ITS-4 (550-750 bp). B) Test using specific oligos Bidwell-1 and Ampel-2 (173 bp). For both tests, lane 1-2: *G. bidwellii*, 3-4: Grape DNA *Plasmopara viticola*, 5-6: *G. endophyllicola*, 7-8: *G. citricarpa*, 9-10: *Verticillium dahliae*, 11-12: *F. oxysporum*, 13-14: *A. alternata*, 15-16: *C. gloeosporioides*, 17: Blank with H<sub>2</sub>O. MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder from Invitrogen.

no mostraron reacción cruzada con ninguno otro hongo, incluido *G. endophyllicola*, el cual es la especie molecularmente más relacionada. Tampoco se observó reacción en el tejido de vid, por lo tanto el genoma de la planta no produce falsos positivos. En adición, se confirmó la especificidad de los oligonucleótidos mediante la secuenciación de los productos de PCR que resultaron positivos en el ensayo, obteniendo un 100% de cobertura e identidad con *G. bidwellii* accesiones KF015253 a KF015255 de Rinaldi *et al.* (2017).

**Ensayo de sensibilidad.** La amplificación del fragmento clonado se inhibió al usar una concentración de 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , por lo que en un segundo ensayo se incluyó una concentración de 1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  donde la banda fue tenue o imperceptible. Todas las demás diluciones mostraron una óptima amplificación, lo que indica que el método es sensible ya que

dilutions showed an optimal amplification, which indicates that the method is sensitive because it allows detecting *G. bidwellii* in concentrations of less than 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  with a lower limit of detection evaluated in 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The test with an extract of grape DNA showed similar results, so the sensitivity of the technique was not affected by the presence of the plant's genome (Figure 3).

The specific oligonucleotides for *G. bidwellii* were designed using as reference all the available sequences of *G. bidwellii f. euvitis* for the ITS region of rDNA, which was chosen to differentiate the species of the *Guignardia* genus (Wikee *et al.*, 2013a), because it is polymorphic. The internal transcribed spacers of this region have been proposed as a universal *DNA Barcoding* for the kingdom *Fungi* because of their high interspecific variability in a wide range of *Eumycetos* (Schoch *et al.*, 2012). Bonants *et al.* (2003), Everett and Rees

permite detectar a *G. bidwellii* en concentraciones menores a  $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  con un límite de detección inferior evaluado en  $0.03 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . El ensayo con el extracto de ADN de vid mostró resultados similares, por lo que la sensibilidad de la técnica no se vio afectada por la presencia del genoma de la planta (Figura 3).

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para *G. bidwellii* tomando como referencia todas las secuencias disponibles de *G. bidwellii f. euvitis* para la región ITS del ADNr, la cual se eligió debido a que es polimórfica para diferenciar a las especies del género *Guignardia* (Wikee *et al.*, 2013a). Además, los espaciadores transcritos internos de esta región han sido propuestos como *DNA Barcoding* universal para el reino *Fungi* debido a su alta variabilidad inter específica en un amplio rango de *Eumycetos* (Schoch *et al.*, 2012). Asimismo, Bonants *et al.* (2003), Everett y Rees (2006) y Peres *et*

(2006) and Peres *et al.* (2007) have successfully developed specific oligonucleotides based on the same ITS region of rDNA for other species of the *Guignardia* genus.

The design of oligos included sequences of representative isolates of the major grape producing regions where the disease is present: United States (Zhang *et al.*, 2013) and Europe (Rinaldi *et al.*, 2017). The sequences of the ATCC 9560 reference control and the cloned control were homologous. Also, for this gene in particular no single-nucleotide polymorphisms were detected for the different geographical origins of the same species, as referred by Wicht *et al.*, (2012). Therefore, although the oligos designed during this study have interspecific strength, the intraspecific variation of subpopulations or haplotypes will require more robust markers (Wicht *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2017).

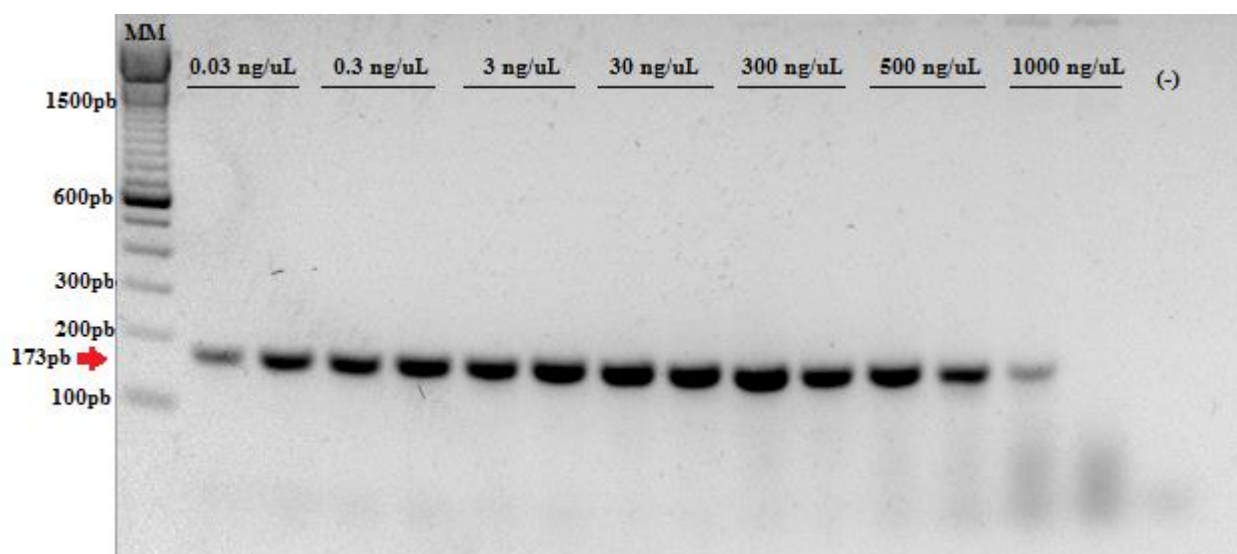


Figura 3. Ensayo de sensibilidad de los oligonucleótidos Bidwell-1 y Ampel-2 utilizando gradiente de diluciones del control clonado en mezcla con  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN de Vid. (-): Blanco con  $\text{H}_2\text{O}$ . MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

Figure 3. Test of sensitivity of oligonucleotides Bidwell-1 and Ampel-2 using a dilutions gradient of the cloned control in a  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  mixture of grape DNA. (-): Blank with  $\text{H}_2\text{O}$ . MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder from Invitrogen.

*al.* (2007) han desarrollado con éxito oligonucleótidos específicos basados en la misma región ITS del ADNr para otras especies del género *Guignardia*.

En el diseño de los oligos se incluyeron secuencias de los aislamientos representativos de las principales regiones vitícolas donde se presenta la enfermedad: Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2013) y Europa (Rinaldi *et al.*, 2017). Las secuencias del control de referencia ATCC 9560 y el control clonado fueron homologas. Asimismo, para este gen en particular no se detectaron polimorfismos de un solo nucleótido para los distintos orígenes geográficos de la misma especie, tal como lo refiere Wicht *et al.* (2012), por lo tanto, los oligos aquí diseñados tienen robustez interespecífica, sin embargo, la variación intraespecífica, de subpoblaciones o haplotipos requerirá de marcadores más robustos (Wicht *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2017).

Respecto al rango de hospedantes y la posible especialización o variantes citadas por Luttrell (1946) y Wicht *et al.* (2012), los oligos diseñados Bidwell y Ampel2 son complementarios en un 100% con las secuencias reportadas para los aislamientos obtenidos del hospedante del género *Vitis*, los ensayos *in silico* e *in vivo* generaron el fragmento esperado de 173 pb. No obstante, el alineamiento con las secuencias de la *f. parthenocissi* mostró un SNP de guanina por timina en la posición 12 del *forward* Bidwell y dos SNP's más en las posiciones ocho y diez del *reverse* Ampel2. En los ensayos *in silico* un solo SNP es suficiente para determinar especificidad entre dos organismos (Stadhouders *et al.*, 2010); sin embargo, *in vivo* la especificidad puede estar dada sólo por los primeros nucleótidos del extremo 3' (Ayyadevara *et al.*, 2000; Stadhouders *et al.*, 2010). En futuras investigaciones se sugiere evaluar los oligos para los aislamientos obtenidos de los hospedantes *Parthenocissus*, *Ampelopsis* y *Cissus*.

Considerando que de acuerdo con Wicht *et al.* (2012) la tasa de crecimiento del hongo en medios

As for the host range and possible specialization or variants cited by Luttrell (1946) and Wicht *et al.* (2012), the Bidwell and Ampel2 oligos designed are 100% complementary to the sequences reported for the isolates obtained from the host of the *Vitis* genus; the *in silico* and *in vivo* tests produced the expected 173 bp fragment. However, the alignment with the sequences of *f. parthenocissi* showed an SNP of guanine rather than thymine at position 12 of *forward* Bidwell, and two additional SNPs at positions 8 and 12 of *reverse* Ampel2. In *in silico* tests only one SNP is enough to determine the specificity between two organisms (Stadhouders *et al.*, 2010), but the *in vivo* specificity could be given only by the first nucleotides of end 3' (Ayyadevara *et al.*, 2000; Stadhouders *et al.*, 2010). We suggest evaluating oligos for the isolates obtained from *Parthenocissus*, *Ampelopsis* and *Cissus* hosts in future studies.

Considering that, according to Wicht *et al.* (2012), the growth rate of the fungus in culture mediums is slow (fruiting bodies take more than two weeks to form), the protocol described here represents a fast and reliable tool to detect and identify the pathogen, because it allows the use of vegetal material infected or mycelium cultured *in vitro* that has been growing for less than a week. Similar protocols have been implemented to detect other fungi that are difficult to isolate, such as *P. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2007) and *Elsinoë fawcettii* (Hyun *et al.*, 2007). Oligos allow a quick differentiation of *G. bidwellii* from the rest of species, but do not allow to differentiate a teleomorph from an anamorph, and for this reason they have to be biologically identified. On the other hand, the PCR assay can be complemented by the one proposed by Everett and Rees (2006) for specific detection of the *G. endophyllicola* endophyte in order to obtain more robust results when diagnosing *G. bidwellii f. euvitis (P. ampelicida)*.

de cultivo es lenta, pudiendo requerir más de dos semanas para la formación de cuerpos fructíferos, el protocolo aquí descrito representa una herramienta rápida y confiable para la detección e identificación del patógeno, al poder realizarse a partir de material vegetal infectado o de micelio cultivado *in vitro* con menos de una semana de crecimiento. Protocolos similares se han implementado para la detección de otros hongos de difícil aislamiento como *P. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2007) y *Elsinoë fawcettii* (Hyun *et al.*, 2007). Los oligos permiten diferenciar rápidamente a *G. bidwellii* del resto de especies, sin embargo, no permiten diferenciar teleomorfo de anamorfo, por lo que la identificación biológica es necesaria. Por otra parte, este ensayo de PCR puede ser complementado por el propuesto por Everett y Rees (2006) para la detección específica del endófito *G. endophyllicola*, a fin de obtener resultados más robustos en el diagnóstico de *G. bidwellii f. euvitis* (*P. ampellicida*).

Finalmente, debido a que la principal fuente de dispersión de la pudrición negra de la vid es la movilización de material propagativo (Wicht *et al.*, 2012), su introducción a regiones vitícolas representa un gran riesgo para la producción, tal como se ha reportado en Europa (Rinaldi *et al.*, 2017). Para México, su introducción pondría repercutir en más de 33 000 ha de vid (SIAP, 2018), debido a que no se cuenta con cultivares resistentes (Ullrich *et al.*, 2009), por lo que la detección oportuna del hongo a partir de material vegetal propagativo y la aplicación de medidas adecuadas de confinamiento y delimitación demandan como una prioridad el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y precisos como lo es la PCR.

Finally, given that the main source to spread grape black rot is mobilization of propagative material (Wicht *et al.*, 2012), its introduction to grape producing zones poses a great risk for this crop, such as that reported in Europe (Rinaldi *et al.*, 2017). In Mexico, its introduction could affect more than 33 000 ha of grape crops (SIAP, 2018), because there are no resistant cultivars (Ullrich *et al.*, 2009). For this reason, developing fast and accurate diagnosis methods such as PCR must be a priority in order to detect the fungus in time by using propagative vegetal material and implementing adequate confinement and delimitation measures.

## CONCLUSIONS

This study reports the development of an end-point PCR test based on the ITS region of rDNA to detect and identify in a specific, fast and simple way *Guignardia bidwellii f. euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*), the causal agent of grape black rot. The test allows to obtain a reliable diagnosis of the fungus and is a starting point for planning and implementing measures to prevent its introduction, thus providing a methodology for timely disease management and supporting the epidemiological surveillance and phytosanitary management programs.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to DGSV-CNRF of SENASICA for directly supporting our research by letting us use equipment and reagents and obtain ATCC isolates.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## CONCLUSIONES

Esta investigación reporta el desarrollo de un ensayo de PCR punto final con base en la región ITS del ADNr para la detección e identificación específica, rápida y sencilla de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*), agente causal de la pudrición negra de la vid, lo cual permite contar con un diagnóstico confiable del hongo siendo punto de partida para la planeación y aplicación de medidas de prevención de la introducción y manejo oportuno de la enfermedad, contribuyendo así con los programas de vigilancia epidemiológica y manejo fitosanitario.

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestra gratitud a la DGSV-CNRF del SENASICA por apoyar directamente en las facilidades para el uso de equipos, reactivos y la adquisición de los aislamientos de la ATCC.

## LITERATURA CITADA

- Altschul FS, Gish W, Miller W, Myers WE and Lipman JD. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ayadevara S, Thaden JJ and Shmookler RJ. 2000. Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 284: 11-18. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4635>
- Bonants JM Peter, Carroll CG, Weerd M, Brouwershaven RI and Baayen PR. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 503-513. <https://doi.org/10.1023/A:1024219629669>
- Cenis LJ. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20 (9): 2380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312363/pdf/nar00083-0171.pdf>
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, J Houbraken. 2005. *Laboratory Manual Series No. 1: Fungal Biodiversity*. CBS Fungal Biodiversity Centre. 425 pp. <http://www.westerdijkinstituut.nl/News/Category/Laboratory%20Manual%20Series>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15. [https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Everett RK and George Rees J. 2006. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. *New Zealand Plant Protection* 59: 141-145. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.902.294&rep=rep1&type=pdf>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999hall1.pdf>
- Humber AR. 1997. *Fungi: Preservation of cultures*. Pp. 269-279. In: Lawrence A. Lacey (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. 409p. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Hyun JW, Peres NA, Yi SY, Timmer LW, Kim KS, Kwon HM and Lim HC. 2007. Development of PCR assays for the identification of species and pathotypes of *Elsinoë* causing scab on citrus. *Plant Disease* 91: 865-870. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0865>
- Luttrell SE. 1946. Black rot of muscadine grapes. *Phytopathology* 36: 905-924. <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43894446/PDF>
- Manchester KL. 1995. Value of A<sub>260/A280</sub> ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19 (2): 208-210. [https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL\\_ID=200902136544040775&rel=0](https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902136544040775&rel=0)
- Matveeva VO, Shabalina AS, Nemtsov AV, Tsodikov DA, Gesteland RF and Atkins FJ. 2003. Thermodynamic calculations and statistical correlations for oligo-probes design. *Nucleic Acids Research* 31 (14): 4211-4217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167637/>
- Motohashi Keiichi, Shigeki Inaba, Kozue Anzai, Susumu Takamatsu and Chiharu Nakashima. 2009. Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu stricto. *Mycoscience* 50: 291-302. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0487-Z>
- Okane I, Lumyong S, Nakagiri A and Ito T. 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44 (5): 353-363. <https://doi.org/10.1007/s10267-003-0128-x>
- Peres NA, Harakava R, Carroll CG, Adaskaveg EJ and Timmer WL. 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease* 91 (5): 525-531. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0525>
- Rinaldi AP, Paffetti D, Comparini C, Brogini ALG, Gessler C and Mugnai L. 2017. Genetic variability of *Phyllosticta ampellicida*, the agent of black rot disease of grapevine. *Phytopathology* 107: 1406-1416. <https://doi.org/10.1094/PHTO-11-16-0404-R>
- Rychlik W. 1995. Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biotechnology* 3 (2): 129-134. <https://doi.org/10.1007/BF02789108>

- Sambrook J and Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. USA. 2344.
- Schoch LC, Seifert AK, Huhndorf S, Robert V, Spouge LJ, Levesque A and Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- SENASICA. 2019. Pudrición negra de la vid (*Guignardia bidwellii*–*Phyllosticta ampellicida*). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No 63. 15p. Consultado en línea el 22/07/2019 a través del portal: [https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Pudrici%C3%B3n%20Negra%20de%20la%20Vid%20\(Guignardia%20bidwellii\).pdf](https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Pudrici%C3%B3n%20Negra%20de%20la%20Vid%20(Guignardia%20bidwellii).pdf)
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola: producción de vid. Consultado online en Abril de 2019 a través de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Stadhouders R, Paz DS, Anber J, Voermans J, Mes MHT and Schutten M. 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 12 (1): 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmol-dx.2010.090035>
- Ullrich IC, Kleespies GR, Enders M and Koch E. 2009. Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal für Kulturpflanzen* 61 (3): 82–90.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Van der Aa H. 1973. Studies in *Phyllosticta*. *Studies in Mycology* 5: 1–110.
- White JT, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. 315–322. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Wicht B, Petrini O, Jermini M, Gessler C and Lodovico BGA. 2012. Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification. *Mycologia* 104(5): 1036–1045. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492405>
- Wicht B, Jermini M, Gessler C and Lodovico BGA. 2014. Microsatellite markers for population studies of the ascomycete *Phyllosticta ampellicida*, the pathogen causing grape black rot. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3): 470–479. <http://www.jstor.org/stable/43871799>
- Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EH, Hyde KD and Crous PW. 2013a. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). *Studies in Mycology* 76: 1–29. <https://dx.doi.org/10.3114%2Fsim0019>
- Wikee S, Lombard L, Crous WP, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Alias AS, McKenzie HCE and Hyde DK. 2013b. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. *Fungal Diversity* 60: 91–105. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0235-8>
- Ye Jian, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden LT. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang Ke, Ning Zhang and Lei Cai. 2013. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*. *Mycologia* 105(4): 1030–1042. <https://doi.org/10.3852/12-392>
- Zuker M. 2003. mFold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: 3406–3415. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169194/>