

## La secuenciación masiva en el diagnóstico de virus de cultivos leñosos

ANTONIO OLMOS, investigador con formación en Biología Molecular, realizó el doctorado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia. Ha basado su actividad en dos aspectos: uno, a corto plazo, para dar una rápida respuesta al sector con la producción de material vegetal libre de virus; y otro, a medio y largo plazo, con el desarrollo de métodos y protocolos de diagnóstico para el control de enfermedades virales. Durante los últimos años ha centrado su actividad en la metodología de la secuenciación masiva que ha permitido el descubrimiento de nuevos virus y la caracterización molecular de variantes divergentes con un enfoque hacia la prevención de virus emergentes en especies vegetales leñosas.

ANA BELÉN RUIZ-GARCÍA, investigadora con formación

ANA BELÉN RUIZ GARCÍA y ANTONIO OLMOS CASTELLÓ

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

Moncada, Valencia

### Introducción

Las tecnologías de secuenciación masiva, también conocidas como NGS o HTS (*Next-Generation Sequencing*, *High-Throughput Sequencing*), tienen varias ventajas sobre los enfoques biológicos, serológicos y moleculares tradicionales, tanto para el diagnóstico de enfermedades como para la detección de virus específicos en plantas leñosas. Entre las ventajas más importantes está que esta técnica no requiere un conocimiento *a priori* sobre los virus que infectan la planta. Esto significa que no es necesario conocer la secuencia genómica de un virus para poder ser detectado, a diferencia de las técnicas de amplificación basadas en la PCR o isotermas, cuyo requisito es el conocimiento de la secuencia genética a detectar para diseñar cebadores o sondas. También presenta ventajas sobre las técnicas ELISA, que se restringen a la detección de virus para los que haya disponibilidad de anticuerpos para el diagnóstico serológico. Estas dos formas de detección, las moleculares y las serológicas tradicionales, son muy específicas y, por tanto, no pueden identificar virus desconocidos o posibles variantes muy divergentes que podrían estar involucrados en la etiología de una enfermedad. El indexaje biológico, si bien puede identificar enfermedades transmitidas por injerto, no ofrece información de los aislados virales implicados en la posible etiología de una enfermedad, y tiene otras problemáticas como la posibilidad de que existan aisla-

dos virales asintomáticos y la necesidad de disponer de instalaciones controladas de invernadero. El uso de HTS facilita el proceso de identificación del agente etiológico de una enfermedad, ya que el método proporciona información del viroma de la planta, a menudo revelando la presencia de nuevos patógenos virales. En lo que respecta a la detección de virus, la aplicación de HTS reduce drásticamente el problema de los falsos negativos producidos por la alta variabilidad genética o el bajo título viral que, con frecuencia, tienen los virus que infectan árboles frutales. Además, el alto número de secuencias diferentes que se obtienen por HTS hace posible la reconstrucción de genomas virales completos, que posteriormente se pueden utilizar para realizar estudios de variabilidad genética o diseñar mejores métodos de diagnóstico específicos. Sin embargo, la validación de las secuencias obtenidas por HTS puede ser necesaria y siempre lo es cuando se trata de variantes muy divergentes o virus desconocidos, para lo cual se necesita aplicar la secuenciación convencional de Sanger. Esta verificación generalmente puede realizarse en diferentes zonas del genoma, en fragmentos del genoma mal cubiertos, o para comprobar posibles combinaciones inusuales.

Entre las tecnologías de HTS, Illumina ofrece diferentes secuenciadores que pueden producir de 4 millones a 20 mil mi-

en Bioquímica y Biología Molecular en mecanismos de regulación de la transcripción y rutas metabólicas de estrés en organismos eucariotas. Realizó el doctorado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Valencia y su postdoctorado con una beca *Human Frontiers* en el NIMR (MRC) de Reino Unido. En los últimos años ha centrado su actividad científica en el desarrollo de "pipelines" bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación masiva y la aplicación de técnicas convencionales para la confirmación de los hallazgos obtenidos, así como la caracterización a nivel molecular de nuevos virus, la determinación de secuencias genómicas de aislados divergentes de virus conocidos y el desarrollo de métodos de diagnóstico.

llones de lecturas cortas, desde 50 hasta 300 nucleótidos. Esta es la tecnología más utilizada en investigación de virus de plantas leñosas y acopla la secuenciación por síntesis a una superficie dividida en carreras. Otras tecnologías más novedosas, que están basadas en la secuenciación en tiempo real de una sola molécula donde no se requiere un paso previo de amplificación para la preparación de la muestra, están aún en desarrollo en fitopatología y su aplicación para la detección de virus de leñosas aún no se ha realizado en profundidad.

### Fases de las tecnologías HTS

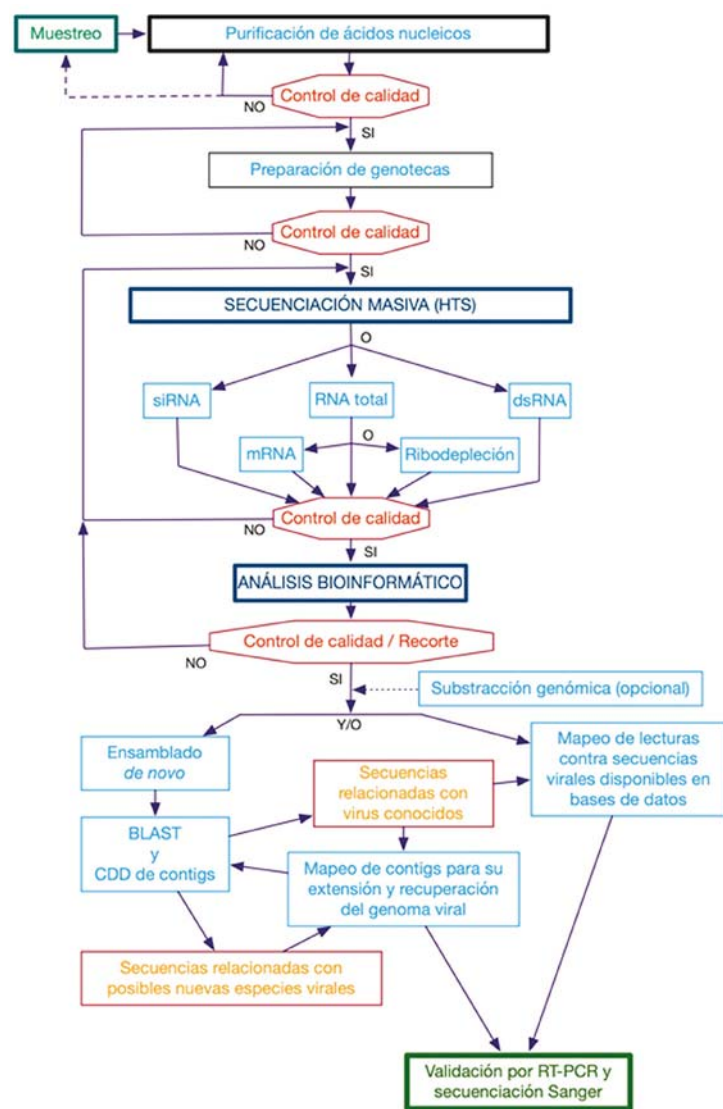
Para poder liberar todo el potencial de las tecnologías HTS, se han de considerar todos los pasos del experimento, desde la preparación de la muestra hasta el análisis bioinformático de los datos. La estandarización de estas tecnologías para ser utilizadas de forma eficaz en diagnóstico requiere una descripción detallada de todo el proceso, desde la purificación de ácidos nucleicos hasta el detalle de los parámetros y programas utilizados<sup>[8]</sup>. En la figura se muestra el procedimiento general de análisis de muestras mediante HTS.

### La preparación de la muestra

#### Pequeños RNA interferentes derivados de virus

Este tipo de muestra fue la que se empleó por primera vez en patología vegetal y se basa en que el silenciamiento génico constituye un mecanismo antiviral importante en las plantas, donde las enzimas de los huéspedes llamadas *dicers* cortan el RNA viral en pequeños RNA interferentes (siRNA)

de 21 a 24 nucleótidos de longitud. Estas moléculas pueden aislarse de las plantas infectadas, someterse a HTS y usarse para reconstruir genomas virales. Los siRNA derivados de virus se han utilizado para detectar virus de plantas conocidos y desconocidos. La ventaja de este enfoque es que los siRNA se pueden utilizar para detectar virus de RNA y virus de DNA, y también para detectar elementos virales endógenos integrados (EVE), siempre y cuando se transcriban. La desventaja de este enfoque es el pequeño tamaño de las lecturas virales, que puede complicar el proceso de ensamblado del genoma, especialmente para los virus desconocidos.



Procedimiento estandarizado de análisis de muestras vegetales de cultivos leñosos mediante HTS (Figura elaborada por los autores).

El uso de las tecnologías de secuenciación masiva (HTS) no requiere un conocimiento *a priori* sobre los virus que infectan la planta

La secuenciación de RNA total se ha utilizado para detectar y caracterizar virus en varios cultivos leñosos

La contaminación, los inhibidores o las impurezas en el material de partida pueden producir resultados y artefactos, falsos negativos e incluso falsos positivos

### RNA bicatenario

El RNA de doble cadena (dsRNA) ha sido empleado para detectar virus por HTS en frutales de hueso, como albaricoquero o cerezo, en cítricos y en vid, y también se ha aplicado al estudio de enfermedades de etiología desconocida. La ventaja de usarlo es que constituye un paso de enriquecimiento de secuencias de ácidos nucleicos virales. Los protocolos actuales se basan en la extracción de fenol/cloroformo para obtener una mezcla de DNA total y RNA, a partir de la cual la fracción de dsRNA se enriquece mediante cromatografía en una matriz de celulosa de polímeros largos. Aunque con este tipo de muestra la detección de virus de DNA puede ser escasa, el dsRNA ha facilitado el descubrimiento de muchos nuevos virus de RNA.

### DNA total

La secuenciación total del DNA apenas se ha utilizado en la detección de virus de plantas leñosas. Se ha aplicado con éxito en cítricos para identificar un nuevo virus de DNA utilizando DNA genómico sometido posteriormente a fragmentación para preparar genotecas compatibles con la secuenciación de Illumina.

### RNA total

La secuenciación de RNA total se ha utilizado para detectar y caracterizar virus en varios cultivos leñosos, como vid, manzano, peral, cerezo, caqui, níspero, olivo, etc. Aunque se puede realizar la purificación tradicional de RNA total, hay kits disponibles comercialmente que se pueden usar. Un inconveniente potencial del método es que el título viral puede ser bajo dentro del fondo del RNA de la planta, una limitación que puede superarse mediante la depleción del RNA ribosómico que es muy abundante en el RNA purificado. Otra alternativa es el enriquecimiento de secuencias virales mediante la purificación de RNA con cola poli(A).

### Ácidos nucleicos asociados a viriones purificados

Los ácidos nucleicos asociados a viriones (VANA) se utilizan para enriquecer la muestra con los ácidos nucleicos virales mediante la purificación de partículas virales del material vegetal. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito la aplicación del método a los virus de árboles frutales. La desventaja de este método es el requisito de procesamiento de muestras complejas. Además, se limita a la detección de virus encapsados.

### Preparación de genotecas

Cada una de las plataformas de secuenciación tiene su propia gama de kits para la preparación de las genotecas. Además, algunos proveedores de servicios para terceros también ofrecen kits o protocolos desarrollados para diferentes plataformas. En plantas leñosas, la tecnología Illumina y los kits de la serie TruSeq™ y versiones Ribo-Zero™ se emplean con frecuencia y de manera satisfactoria. Aunque estos procesos requieren una manipulación significativa, tiempo y habilidad, actualmente existen sistemas automatizados disponibles comercialmente capaces de producir genotecas de ácidos nucleicos listas para su secuenciación. Los resultados óptimos se obtienen utilizando ácidos nucleicos de muy buena pureza. La contaminación, los inhibidores o las impurezas en el material de partida pueden producir resultados y artefactos, falsos negativos e incluso falsos positivos por contaminación con muestras analizadas en paralelo. En detección de virus de plantas leñosas se han empleado diferentes tipos de ácidos nucleicos como muestra.

### Análisis bioinformático

Los datos se pueden analizar con programas disponibles comercialmente como CLC Genomics Workbench o Geneious Prime o se pueden analizar con plataformas



Los datos pueden ser recortados y filtrados para eliminar secuencias de baja calidad mediante diferentes programas

Se han obtenido genomas virales completos o grandes fragmentos de ellos utilizando como muestra de partida siRNA, dsRNA o RNA total

abiertas, que, en general, requieren conocimientos de Linux. Existen programas, algunos disponibles en web, o compilaciones automáticas para la identificación de virus, como el VirusFinder, VirusHunter, VirFind, ezVIR, ViromeScan, Taxonomer, VIP, VirusDetect, VSD toolkit o el Metavisitor, entre otros.

El control de calidad, el ensamblado de secuencias *de novo*, la anotación de los *contigs* generados, el mapeo de los *contigs* para su extensión y el mapeo de secuencias de referencia son pasos necesarios para el análisis de datos. El control de calidad depende de la tecnología y de los parámetros estándar, cuyos umbrales suelen ser proporcionados por el fabricante. Sin embargo, un primer paso crítico y común en el análisis de datos bioinformáticos, es evaluar la calidad de los datos y realizar recortes y filtrados para eliminar lecturas de baja calidad y otras secuencias contaminantes como son los adaptadores. Un pequeño paquete de *software* de interfaz gráfica de usuario, llamado FastQC, es muy útil para evaluar la calidad de los datos y la presencia de secuencias contaminantes en módulos fáciles de interpretar y usar. Los datos pueden ser recortados y filtrados para eliminar secuencias de baja calidad mediante diferentes programas como Prinseq o Trimmomatic, que son paquetes de *software* útiles que se pueden usar para recortar adaptadores y nucleótidos de baja calidad.

El ensamblado de las lecturas o secuencias para recuperar un genoma viral puede basarse en dos enfoques diferentes: ensamblado *de novo*, donde los genomas virales se reconstruyen parcial o totalmente, y el mapeo de las lecturas contra una secuencia de referencia.

El ensamblado *de novo* puede realizarse con *software* cómodo y fácil de usar, como los comentados anteriormente, CLC Genomics Workbench o Geneious Prime, o bien con otros de entorno Linux como

CAP3, Velvet, MIRA, Flye, SPAdes o Tadpole. Se puede realizar un paso opcional de filtrado del genoma de la planta huésped antes del ensamblado *de novo* para eliminar la mayoría de las lecturas relacionados con genoma de la planta, mapeando las secuencias frente a genomas de la planta huésped disponibles en bases de datos o repositorios. El ensamblado *de novo* tiene limitaciones, especialmente cuando lo que se tiene es una muestra con diferentes variantes o cepas virales de la misma especie. Este análisis es particularmente problemático cuando se emplea siRNA como muestra a secuenciar, debido a la baja longitud de las lecturas que pueden producir resultados falsos positivos o un ensamblaje incorrecto. En este caso, una estrategia que utiliza lecturas más largas (por ejemplo, 100 nucleótidos o más) puede ayudar a resolver el problema, ya que, empleando parámetros más estrictos de ensamblado, se facilita la recuperación de cada una de las variantes que infectan la muestra. Posteriormente, estas variantes deben comprobarse mediante amplificación por PCR y análisis de RFLP.

La anotación de *contigs* se realiza utilizando BLASTn, BLASTx, BLASTp y tBLASTx. El mapeo de las secuencias frente a genomas de referencia o frente a los *contigs* generados para su extensión también puede realizarse con CLC Genomics Workbench o Geneious Prime, o con programas de entorno Linux como Bowtie, Bowtie2, Minimap2, Tophat o BMap. Para los virus de árboles frutales con bajo título puede ser necesaria una combinación de ambos enfoques, junto con una mayor profundidad de secuenciación.

### HTS aplicado a cultivos leñosos

Se han obtenido genomas virales completos o grandes fragmentos de ellos utilizando como muestra de partida siRNA, dsRNA o RNA total<sup>[10]</sup>. Continuamente se describen nuevos virus así como nuevas cepas/variantes de secuencias de especies

La HTS sobresale en la identificación de virus desconocidos y en la identificación de variantes genéticas de una especie de virus que coexisten en el mismo árbol

La presencia de un nuevo virus y su asociación a una enfermedad debe confirmarse mediante la detección convencional en estudios más amplios

virales conocidas. Sin embargo, donde la HTS sobresale es en la identificación de virus desconocidos y en la identificación de variantes genéticas de una especie de virus que coexisten en el mismo árbol. La capacidad de producir genomas completos a partir del ensamblado *de novo*, en combinación con una buena profundidad de secuenciación, puede revelar la presencia de virus nuevos o infecciones mixtas de cepas/aislados estrechamente relacionados. En los cultivos perennes leñosos, la infección simultánea por diferentes virus que potencialmente pueden actuar entre sí mediante sinergismo o antagonismo es una característica común, por lo que resulta complicado identificar el agente infeccioso en enfermedades de etiología desconocida. En este sentido, la recuperación de secuencias de una especie viral puede no ser suficiente para la asociación de causalidad a una enfermedad. Por lo tanto, la presencia de un nuevo virus y su asociación a una enfermedad debe confirmarse mediante la detección convencional en estudios más amplios.

Un ejemplo del potencial de las HTS aplicado al estudio de enfermedades de cítricos es el descubrimiento de una cepa atípica del virus de la leprosis citoplasmática de los cítricos (CiLV-C2)<sup>[7]</sup>, encontrada por HTS y no detectada por herramientas moleculares específicas para CiLV-C. Por el contrario, en la enfermedad de muerte súbita de los cítricos, que parece estar asociada a una cepa específica de citrus sudden death-associated virus (CSDaV)<sup>[5]</sup>, el estudio por HTS no es totalmente concluyente, por lo que se requeriría un estudio más profundo para confirmar esta hipótesis.

Avances en el conocimiento del viroma de la vid también han sido impulsados por las tecnologías HTS, incrementándose el número de nuevas especies virales de diferentes géneros, como, por ejemplo, los vitivirus o el badnavirus asociado a la

enfermedad de la decoloración de la hoja de roditis, cuyo agente causal era desconocido desde hacía más de 50 años<sup>[3]</sup>. Otros virus nuevos de vid que se han identificado mediante el empleo de HTS son grapevine syrah virus 1 (GSyV-1), empleando como muestra RNA total y dsRNA; grapevine vein-clearing virus (GVCV) y grapevine pinot gris virus (GPGV), mediante HTS de siRNA; o grapevine virus F (GVF) y grapevine red blotch associated virus (GRBaV), mediante secuenciación de dsRNA<sup>[10]</sup>.

De forma similar, en frutales, la aplicación de las HTS ha supuesto un avance en diversos ámbitos, como, por ejemplo, en el diseño de métodos de diagnóstico basados en PCR aplicando los resultados de HTS para diseñar y actualizar técnicas de diagnóstico<sup>[4]</sup>. Nuevas especies de virus se descubren continuamente impulsando la taxonomía, por ejemplo, recientemente el empleo de HTS de RNA total ha permitido descubrir una nueva especie con homología de secuencias con los ilarvirus, infectando cerezo dulce. Se ha propuesto el nombre de prunus virus I (PrVI) para este nuevo virus<sup>[6]</sup>. Otro ejemplo es el análisis por HTS de dsRNA en albaricoquero, que permitió también la identificación de un nuevo virus con una asignación filogenética limítrofe al virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV), denominándose el virus asociado al aclaramiento de las venas del albaricoquero (AVCaV)<sup>[4]</sup>. Esta especie está localizada entre los citrivirus y vitivirus lo que condujo a una propuesta para un nuevo género en *Betaflexiviridae*. También la recuperación de nuevas secuencias de virus relacionadas con la familia *Luteoviridae*, como el luteovirus asociado a cerezas, el virus asociado a picaduras de tallo de nectarina y un nuevo luteovirus que infecta almendro<sup>[2]</sup>.

El análisis por HTS del RNA total de muestras de olivo con amarilleamiento en hojas y deformaciones en madera ha

El empleo de HTS no solo ha permitido la identificación de nuevos virus, sino que también está haciendo avanzar la taxonomía, revelando nuevas especies de virus

La detección de un bajo número de lecturas de un genoma viral podría indicar la presencia de un virus en un título bajo o la contaminación de la muestra durante la manipulación

El análisis de datos de HTS requiere el uso de herramientas bioinformáticas sofisticadas por parte de personal científico especializado

permitido el avance en el conocimiento de un virus para el que solo se disponía de secuencias parciales, el closterovirus olive leaf-yellowing associated virus (OLYaV), cuyo análisis filogenético lo ha situado junto a otros dos closterovirus que codifican una proteína similar a la taumatina y que no están asignados actualmente a ningún género, por lo que constituyen con mucha probabilidad un nuevo género en la familia *Closteroviridae*<sup>[9]</sup>.

Así pues, el empleo de HTS no solo ha permitido la identificación de nuevos virus, sino que también está haciendo avanzar la taxonomía, revelando, en los últimos años, la presencia de un gran número de nuevas especies de virus, cuyo significado biológico se desconoce. Para algunos de estos virus, se pueden inferir una serie de rasgos biológicos basados en la homología que comparten con especies ya caracterizadas. Sin embargo, para muchos, aún es discutible si representan virus infecciosos de plantas que tienen importancia económica. La identificación de una nueva especie de virus vegetal podría afectar al comercio de material vegetal entre los países y, por lo tanto, los datos biológicos deben proporcionarse poco después de la identificación inicial del patógeno, a fin de evaluar mejor su importancia.

A pesar de los avances en el campo de la tecnología HTS no hay umbrales establecidos del número de lecturas necesarias para identificar la presencia de una especie de virus en una muestra, así como identificar posibles contaminaciones entre muestras analizadas simultáneamente. La detección de un bajo número de lecturas de un genoma viral podría indicar la presencia de un virus en un título bajo o la contaminación de la muestra durante la manipulación. Por lo tanto, la aplicación adicional de técnicas moleculares/serológicas específicas de la especie sigue siendo necesaria para confirmar tales hallazgos. Otro inconveniente de las tecnologías

HTS es el impacto que puede tener la naturaleza de la muestra de partida, si se trata de siRNA, dsRNA o RNA total, en el tipo de patógenos virales detectados. Esta dependencia de muestra puede ser importante para el diagnóstico de virus de DNA que pueden no estar presentes en genotecas basadas en dsRNA y, del mismo modo, en el caso del enriquecimiento utilizando la cola poli(A), donde no se detectarán los virus que carecen de ella. Por otro lado, el enfoque VANA detecta con éxito tanto virus de RNA como de DNA, pero no es capaz de detectar agentes que no están encapsulados, como viroides y endornavirus. Dados los beneficios y limitaciones de cada enfoque, se debe considerar seriamente la selección de la muestra que se va a secuenciar.

La mayoría de los virus que infectan árboles tienen genomas de RNA, tienen una etapa de dsRNA durante su replicación, pueden tener una cola poli(A) y encapsidarse para la transmisión y el movimiento. Sin embargo, el reciente aumento en la identificación de virus de DNA que infectan árboles, virus que carecen de cola poli(A) (por ejemplo, luteovirus) y la importancia de las enfermedades relacionadas con viroides, posiblemente hacen que los siRNA o RNA total sean las muestras de elección para una identificación exhaustiva de los virus presentes en una muestra. Otro inconveniente importante de HTS es el hecho de que, contrariamente a los métodos de detección clásicos, el análisis de datos de HTS requiere el uso de herramientas bioinformáticas sofisticadas por parte de personal científico especializado. Dependiendo de la muestra analizada, se pueden encontrar diferentes obstáculos durante el análisis bioinformático.

La aplicación de HTS conducirá a la identificación de la mayoría de los virus y viroides presentes en cada especie huésped, actualizando sus datos de viroma. Esta extensa base de datos de diferentes aislamientos



Con la ayuda de las HTS se facilitará el estudio de las interacciones entre diferentes virus o genotipos de virus, desvelando mecanismos de patogénesis y desarrollo de enfermedades

tos de los virus que infectan árboles, será capaz de optimizar los ensayos de detección existentes abordando una de las principales deficiencias para las metodologías tradicionales, que es la alta variabilidad de secuencia presente en virus que infectan árboles frutales. La optimización de los cebadores existentes basados en secuencias de diferentes aislados, y las variantes de estos aislados presentes en una muestra, minimizarán los resultados falsos negativos, lo que permitirá ensayos de diagnóstico más precisos. Además, la evaluación de los nuevos virus identificados proporcionará una lista completa de patógenos que representan amenazas potenciales, y permitirán la actualización de las listas de cuarentena.

Las técnicas HTS han demostrado ser una herramienta valiosa en la identificación de mezclas de genotipos dentro de una sola planta. Con la ayuda de esta tecnología, se facilitará el estudio de las interacciones entre diferentes virus o genotipos de virus, desvelando mecanismos de patogénesis y desarrollo de enfermedades. Es importante destacar que el método podría usarse para el estudio de interacciones planta-virus-vector a través de análisis transcriptómicos o estudios de mecanismos de resistencia, como el silenciamiento del RNA, actuando contra virus en diferentes especies de árboles frutales, que al final, podrían conducir al desarrollo de nuevas herramientas de control.

## REFERENCIAS

- [1] Diaz-Lara, A. *et al.* (2020). "Comprehensive real-time RT-PCR assays for the detection of fifteen viruses infecting *Prunus* spp.". *Plants* **9**: 273.
- [2] Khalili, M. *et al.* (2020). "Complete genome sequence of almond luteovirus 1, a novel luteovirus infecting almond". *Arch. Virol.* **165**: 2123-2126.
- [3] Maliogka, V. *et al.* (2015). "A novel grapevine badnavirus is associated with the roditis leaf discoloration disease". *Virus Res.* **203**: 47-55.
- [4] Marais, A., Faure, C. y Candresse, T. (2016). "New insights into Asian prunus viruses in the light of NGS-based full genome sequencing". *PLoS ONE* **11**: e0146420.
- [5] Matsumura, E. E., *et al.* (2017). "Deep sequencing analysis of RNAs from citrus plants grown in a citrus sudden death-affected area reveals diverse known and putative novel viruses". *Viruses* **9**: 92.
- [6] Orfanidou, C. G. *et al.* (2021). "Identification and sequence analysis of a novel ilarvirus infecting sweet cherry". *Plants* **10**: 514.
- [7] Roy, A. *et al.* (2013). "A case study on discovery of novel citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 utilizing small RNA libraries by next generation sequencing and bioinformatic analyses". *J. Data Min. Genom. Proteom.* **4**: 129.
- [8] Ruiz-García, A. B. *et al.* (2019). "Bioinformatic tools and genome analysis of citrus tristeza virus". *Methods Mol. Biol.* **2015**: 163-178.
- [9] Ruiz-García, A. B. *et al.* (2020). "Molecular characterization of the complete coding sequence of olive leaf yellowing-associated virus". *Plants* **9**: 1272.
- [10] Villamor, D. E. V. *et al.* (2019). "High throughput sequencing for plant virus detection and discovery". *Phytopathol.* **109**: 716-725.

