



Sociedad  
Española  
de **Ciencias**  
**Hortícolas**

**97**

**Septiembre**  
**2024**

# **ACTA DE HORTICULTURA**

**Comunicaciones Técnicas**  
**Sociedad Española de**  
**Ciencias Hortícolas**

**XI Congreso Nacional de**  
**Mejora Genética de Plantas**

**Editores:**  
**Margarita López Corrales**  
**M<sup>a</sup> Engracia Guerra Velo**  
**María Ramos García**  
**Antonio Jesús Galán Jiménez**

**Cáceres, 24-26 de septiembre de 2024**

## **Identificación molecular de los organismos patógenos causantes de las enfermedades de oídio (*Erysiphe necator*) y mildiu (*Plasmopara viticola*) en vid a partir de muestras de inóculo aéreo**

J. Balduque-Gil<sup>1,2</sup>, A. Garcés-Claver<sup>2,3</sup>, I. Pérez-Lamuela<sup>3</sup>, J.J. Barriuso<sup>2,4</sup> y O. Fayos<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM Zaragoza), Av. Montañana 1005, 50059 Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, España.

<sup>3</sup>Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universidad de Zaragoza, Avenida Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España.

**Palabras Clave:** gestión integrada de plagas, hongos fitopatógenos, marcadores moleculares

### **Resumen**

Las enfermedades fúngicas como el oídio (*Erysiphe necator*) y el mildiu (*Plasmopara viticola*) suponen un grave problema en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), debido a las grandes pérdidas económicas que ocasionan. La identificación temprana de ambos parásitos es esencial para el adecuado control de plagas y enfermedades en el cultivo de la vid. En este sentido, el enfoque global y alternativo de la Gestión Integrada de Plagas (GIP) permitiría el control de estos organismos fitopatógenos reduciendo el uso de fitosanitarios. El muestreo de propágulos en el aire para modelizar el desarrollo de enfermedades y optimizar el uso de sistemas de apoyo a las decisiones es una de las estrategias más novedosas de la GIP. Por ello, el objetivo de este trabajo se ha centrado en el desarrollo de una metodología capaz de identificar la presencia de propágulos de *E. necator* y *P. viticola* en cintas adhesivas, similares a las que contienen los ciclones colectores de polen. Para ello, se han evaluado cuatro métodos de extracción de ADN y cinco parejas de cebadores. Los mejores resultados se han obtenido mediante la extracción directa de ADN con un kit comercial. Además, dos de los cebadores evaluados han permitido determinar la presencia de oídio y mildiu en las cintas adhesivas inoculadas. Estos resultados servirán de base para la aplicación de una metodología sencilla, rápida y efectiva para la identificación temprana de *E. necator* y *P. viticola* en muestras de inóculo aéreo, esencial en la protección de cultivos.

### **INTRODUCCIÓN**

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial por los múltiples usos de la uva dentro del sector agroalimentario: en fresco, como uva de mesa, en seco, como uva pasa y, procesado, como zumo, mosto y vino. En España, el cultivo de la vid es de gran importancia, tanto a nivel económico, social como medioambiental. En el año 2022 se destinaron 922.920 ha para su cultivo y se obtuvieron más de 5,9 millones de toneladas de uva (FAOSTAT, 2023). En este sentido, la protección de los cultivos frente a plagas y enfermedades es de gran interés para el sector vitivinícola ya que afecta tanto a la calidad como a la producción. Una de las principales amenazas para el cultivo de la vid, son las enfermedades fúngicas que generan importantes mermas en la producción y, por tanto, grandes pérdidas económicas. Dos de las principales especies de organismos fitopatógenos que afectan al cultivo de la vid son *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni y *Erysiphe necator* (syn. *Uncinula necator* (Schwein.) Burrell) Schwein, causantes de las enfermedades del mildiu y del oídio, respectivamente. El desarrollo de variedades resistentes a enfermedades, como el oídio y el mildiu, mediante la mejora genética, en combinación con una adecuada Gestión Integrada de Plagas (GIP), en la que se priorizan las medidas preventivas evitándose así el uso excesivo de fitosanitarios, son estrategias complementarias en el control eficaz

de estos organismos patógenos. Una de las medidas más novedosas para la GIP, en el cultivo de la vid, es el muestreo de patógenos en inóculo aéreo, mediante sistemas que capturan muestras de aire. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo se ha centrado en el establecimiento de un protocolo para la rápida identificación molecular de las especies fúngicas *P. viticola* y *E. necator* en muestras de inóculo aéreo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La optimización del protocolo de extracción de ADN fúngico se realizó con cintas adhesivas (2 x 33,6 cm), iguales a las utilizadas en los ciclones colectores de propágulos de aire, inoculadas con oídio o con mildiu mediante frotación con material vegetal infectado. Asimismo, se trabajó con material vegetal (hoja y uva) sano, uva infectada con oídio y hoja infectada con mildiu, para evaluar si la matriz interfería en el proceso. En primer lugar, cada cinta inoculada se cortó en 12 fragmentos de 1x1,2 cm, para el adecuado procesado de la muestra, los cuales se observaron mediante microscopía óptica, sin ningún tipo de tinción, con el fin de confirmar la presencia de propágulos de oídio o de mildiu. Para cada método de extracción evaluado y por cada patógeno se utilizaron 3 fragmentos de cinta (Tabla 1). Los métodos de extracción del ADN de las cintas inoculadas que se evaluaron fueron: dos basados en el método de extracción del ADN con CTAB pero con preparación previa de la muestra, una con un homogeneizador con agitación a alta velocidad (T-CTAB) y la otra con un sonicador (U-CTAB) y otros dos métodos de extracción directa con kits comerciales sin preparación previa de la muestra, Extract-N-Amp Plant PCR (Sigma Aldrich, EE. UU.) y PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Por otro lado, el ADN de las muestras de material vegetal se extrajo únicamente mediante el método de CTAB con algunas modificaciones (Garcés-Claver et al., 2007). La concentración del ADN extraído se midió mediante fluorometría en un equipo Qubit (Qiagen). Posteriormente, se procedió a la determinación molecular de ambos organismos, mediante amplificación por PCR usando cinco parejas de marcadores moleculares descritos en bibliografía: Nad9 cob-F/Nad9 cob-R y Giop-F/Giop-R específicos para mildiu (Valsesia et al., 2005; Basha et al., 2021) y Uncin144/511, Cytb-F/Cytb-R y moE11-F/moE11-R específicos para oídio (Péros et al., 2006; Falacy et al., 2007; Basha et al., 2021).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cintas adhesivas inoculadas se visualizaron al microscopio óptico y se seleccionaron aquellos fragmentos de cinta en los que se observó presencia de propágulos de mildiu (Fig. 1A) o de oídio (Fig. 1B). A diferencia de otros trabajos previos en los que utilizan diferentes tinciones para visualizar los propágulos de los organismos (Díez-Navajas et al., 2013; Vági et al., 2016), en este trabajo no se utilizó ninguna tinción, lo cual permitió extraer el ADN de las mismas muestras que se observaron en el microscopio.

Las concentraciones de ADN obtenidas con los distintos métodos de extracción a partir de cinta inoculada variaron desde las no detectadas utilizando los métodos CTAB hasta aquellas que estuvieron en el rango 5,12 - 8,1 ng/ml utilizando el método Extract-N-Amp Plant PCR (Tabla 1).

Por otro lado, de las cinco parejas de cebadores utilizadas para la detección de oídio y mildiu, solo dos de ellas permitieron obtener resultados positivos y específicos en las muestras analizadas. Así, con los cebadores Nad9 cob-F/Nad9 cob-R, específicos de mildiu, se amplificó el fragmento esperado de 520 pb en las nueve muestras inoculadas con mildiu y extraídas con los dos métodos de CTAB y el kit comercial Extract-N-Amp Plant PCR (Fig. 2). También en las muestras de material vegetal infectado con mildiu. A su vez, la pareja de cebadores Uncin144/511, específicos de oídio, amplificó el fragmento esperado de 367 pb en tres muestras de cintas inoculadas con oídio: una muestra extraída con el método T-CTAB y otras dos con el kit comercial Extract-N-Amp Plant PCR. En las tres muestras de tejido vegetal (uva) infectado con oídio también se amplificó el fragmento esperado. El resto de cebadores utilizados no permitieron identificar específicamente los patógenos en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos con el método de extracción de ADN mediante el kit comercial Extract-N-Amp Plant PCR, combinados con la rapidez del procedimiento de extracción sin preparación previa de la muestra, permiten concluir que este protocolo puede resultar muy útil para la determinación de la presencia de patógenos fúngicos en cintas adhesivas con inóculo aéreo. Además, los cebadores Nad9 cob-F/Nad9 cob-R y Uncin144/511 resultaron adecuados para la determinación específica de los dos patógenos en las cintas inoculadas, así como en material vegetal inoculado. Este método servirá de base para el desarrollo y la implantación de un método rutinario en la detección temprana de oídio y mildiu en los viñedos, siendo de gran utilidad para el control de la sanidad de los cultivos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por la Unión Europea a través del programa GRAPEVINE, Connecting Europe Facility, Grant Agreement INEA/CEF/ICT/A2018/1837816 y por el Gobierno de Aragón (Grupos A11-20R y A08-20R).

## REFERENCIAS

- Basha, J.S., Kamalakannan, A., Saraswathy, S., Johnson, I., Ganapati, P.S. and Lakshmi, K.R. 2021. Rapid detection of airborne inocula of grapevine mildews using PCR and lamp assay. *Intl. J. Plant and Soil Sci.* 33: 12–21.
- Díez-Navajas, A.M., Huerga, V. y Ortiz-Barredo, A. 2013. Captura y determinación molecular de esporas para la detección temprana de mildiu, oídio y botritis en viñedo. *Horticultura.* 308: 26–29.
- FAOSTAT. Base de datos estadísticos de la FAOSTAT. Consultado en mayo de 2024, disponible en <http://www.fao.org>.
- Falacy, J. S., Grove, G.G., Mahaffee, W.F., Galloway, H., Glawe, D.A., Larsen, R.C. and Vandemark, G.J. 2007. Detection of *Erysiphe necator* in air samples using the polymerase chain reaction and species-specific primers. *Phytopathology.* 97: 1290–1297.
- Garcés-Claver, A., Moore Fellman, S., Gil-Ortega, R., Jahn, M. and Arnedo-Andrés, M.S. 2007. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor. Appl. Genet.* 115: 907–916.
- Péros, J.P., Michel-Romiti, C., Troulet, C. and Notteghem, J.L. 2006. New rapid PCR protocols to distinguish genetic groups in *Erysiphe necator*. *Vitis.* 45: 47–48.
- Vági, P., Caffi, T., Zoltán Váczy, K., Németh, M.Z. and Kiss, L. 2016. Refining a method for ascospore viability testing in overwintering chasmothecia of *Erysiphe necator*. *European Journal of Plant Pathology.* 144: 799–802.
- Valsesia, G., Gobbin, D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I. and Gessler, C. 2005. 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.* 95: 672–678.

Tabla 1. Muestras de cinta inoculada con los dos patógenos y material vegetal (hoja y uvas) inoculados y sin inocular que se han utilizado en los cuatro métodos de extracción de ADN. Concentración de ADN medida mediante fluorometría.

Código muestra	Tipo muestra	Fitopatógeno	Método extracción	Concentración (ng.µL <sup>-1</sup> )	Código muestra	Tipo muestra	Fitopatógeno	Método extracción	Concentración (ng.µL <sup>-1</sup> )
1	Cinta	Oídio	U-CTAB	nd	19	Cinta	Oídio	PrepMan	3,08
2	Cinta	Oídio	U-CTAB	nd	20	Cinta	Oídio	PrepMan	4,58
3	Cinta	Oídio	U-CTAB	nd	21	Cinta	Oídio	PrepMan	2,12
4	Cinta	Mildiu	U-CTAB	nd	22	Cinta	Mildiu	PrepMan	4,58
5	Cinta	Mildiu	U-CTAB	nd	23	Cinta	Mildiu	PrepMan	3,38
6	Cinta	Mildiu	U-CTAB	nd	24	Cinta	Mildiu	PrepMan	3,34
7	Cinta	Oídio	T-CTAB	nd	25	Hoja	sin inocular	CTAB	6,36
8	Cinta	Oídio	T-CTAB	nd	26	Hoja	sin inocular	CTAB	9,34
9	Cinta	Oídio	T-CTAB	nd	27	Hoja	sin inocular	CTAB	16,9
10	Cinta	Mildiu	T-CTAB	nd	28	Hoja	Mildiu	CTAB	nd
11	Cinta	Mildiu	T-CTAB	nd	29	Hoja	Mildiu	CTAB	8,66
12	Cinta	Mildiu	T-CTAB	nd	30	Hoja	Mildiu	CTAB	5,46
13	Cinta	Oídio	Extract-N	8,1	31	Uva	sin inocular	CTAB	18
14	Cinta	Oídio	Extract-N	5,68	32	Uva	sin inocular	CTAB	24,4
15	Cinta	Oídio	Extract-N	4,74	33	Uva	sin inocular	CTAB	19,7
16	Cinta	Mildiu	Extract-N	6,76	34	Uva	Oídio	CTAB	16,1
17	Cinta	Mildiu	Extract-N	7,1	35	Uva	Oídio	CTAB	16,7
18	Cinta	Mildiu	Extract-N	5,12	36	Uva	Oídio	CTAB	12,3

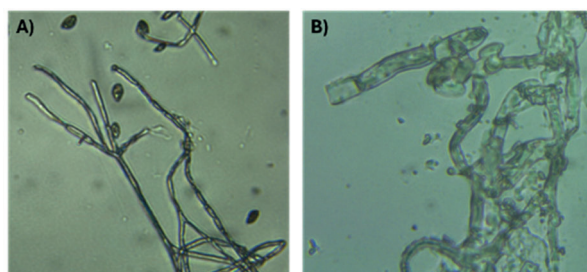


Fig. 1. A) Observación al microscopio de estructuras de mildiu (aumento 40X). B) Observación al microscopio de estructuras de oídio (aumento 40X).

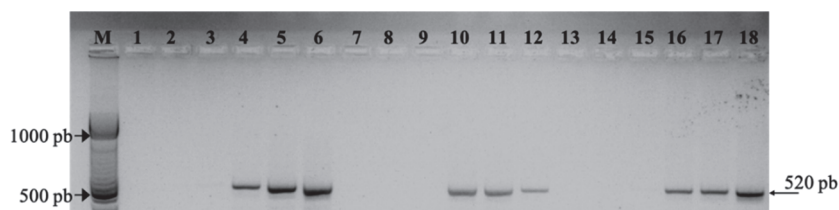


Fig. 2. Productos de amplificación, correspondientes al fragmento esperado de 520 pb, obtenidos con los cebadores específicos de mildiu Nad9 cob-F/Nad9 cob-R en las muestras de cinta inoculadas con mildiu (4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, y 18). Las muestras inoculadas con oídio (1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15) no mostraron amplificación. Carril M: Marcador GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus.