

# Agricultura sostenible: detección de la podredumbre gris determinada por PCR en viñedos de Querétaro

Yara Suhan Juárez Campusano  
Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Ramón Álvar Martínez Peniche  
Lourdes Soto Muñoz  
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro  
juca.suhan@gmail.com

## RESUMEN

El cultivo de la vid ha cobrado importancia en Querétaro, debido a que su producción repercute en la economía del estado; sin embargo, parte de esa producción se pierde debido a enfermedades, como la podredumbre gris, ocasionada por el hongo *Botrytis cinerea*. Para su pertinente control, es necesario optar por un método de detección, como las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El objetivo fue estandarizar la PCR convencional para detectar *B. cinerea* en vid; para ello, se muestrearon uvas cv. "Merlot" en viñedos del estado: El Rosario (FRo), Bodegas de Cote (BCo) y Azteca (VAz). La PCR convencional se optimizó utilizando dos pares de oligonucleótidos específicos para *B. cinerea* (C729+/- y BC108/53) y se validó amplificando ADN de diferentes cepas de *B. cinerea* y otros microorganismos asociados a la vid. Finalmente, la técnica estandarizada se utilizó para determinar la incidencia de *B. cinerea* en los viñedos. Los iniciadores C729+/- presentaron un amplicón de 750 pb solo con el ADN de *B. cinerea*. Los viñedos mostraron baja incidencia de *B. cinerea* (15%); la más alta fue en VAz ( $p=0.017$ ), seguido de BCo y FRo. Entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas; se obtuvo 9.5 y 7.5%, respectivamente. La diferencia obtenida en la incidencia podría atribuirse al manejo cultural del

viñedo y al inoculo primario presente en campo, puesto que no se encontró relación con las condiciones climáticas.

## ANTECEDENTES

La incidencia de enfermedades disminuye la producción y calidad de las cosechas (Hoffmann *et al.*, 2012). La agricultura sostenible es una práctica dirigida a disminuir el impacto sobre los ecosistemas y mantener la producción de recursos productivos (Wezel *et al.*, 2014); por lo tanto, una pieza clave se enfoca en el manejo de enfermedades que, intrínsecamente, conllevarían su detección en etapas de infección y proceder a un tratamiento, pero esto habitualmente no se realiza. Una técnica que vale destinar con este objeto es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se busca amplificar una región específica del genoma de un patógeno de interés agrícola para demarcar su presencia en un hospedero (Khazaeli *et al.*, 2012).

El modelo a emplear es un hongo ascomicete ampliamente distribuido en cultivos de frutos y hortalizas, nombrado *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris (Pande *et al.*, 2006). Uno de sus hospederos es la vid, que es infectada independientemente de la etapa fenológica y manifiesta la enfermedad en el periodo de maduración del fruto (Elmer y Michailides, 2007).

El beneficio económico de productos derivados de la vid, como lo es el vino, ha promovido que se invierta en obtener un producto de buena calidad y, por supuesto, libre de patógenos. Dado esto, resulta pertinente la detección de la podredumbre gris por medio de la PCR, pues proporcionaría información para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad.

## DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La podredumbre gris genera pérdidas en el proceso productivo de la vid y, ya que este cultivo ha adquirido gran importancia económica, es necesario el empleo de herramientas moleculares

que otorguen un panorama del estado de salud de los viñedos.

#### JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El control de *B. cinerea* radica en el empleo de técnicas de detección inicial, como la PCR, caracterizada por ser específica y altamente sensible, lo que permite detectar al patógeno de manera oportuna.

#### HIPÓTESIS

La amplificación de una región específica del genoma de *B. cinerea*, mediante el uso de los oligos C729+/- y BC108/563, permitirá su detección en etapas de infección de la vid.

#### OBJETIVO

Detectar la presencia de *B. cinerea* en etapas de infección en viñedos de Querétaro.

#### METODOLOGÍA

En septiembre de 2015, se colectaron muestras en tres viñedos de Querétaro: Finca el Rosario (FRo), Bodegas de Cote (BCo) y Viñedos Azteca (VAz). En cada uno se realizó un muestreo sistemático al azar de la cv. Merlot. Parte de los frutos se congeló a -20 °C; el otro se utilizó para la recuperación del hongo y estandarización de extracciones de ADN (Khazaeli *et al.*, 2012). Se evaluaron tres métodos de recuperación de esporas con fruto infectado: 1) extracción directa de la cutícula; 2) congelación con N<sub>2</sub>; 3) agitación del fruto en medio líquido y extracción al sobrenadante (Kisluk *et al.*, 2012).

Posteriormente, se extrajo ADN a las muestras por el método de Crespo-Sempere *et al.* (2013) y se midió la concentración y pureza del ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 1000. Se evaluaron las condiciones de reacción de los oligos C729 (+AGCTCGAGAGAGATCTCTGA y -CTGCAATGTTCTGCGTGGAA) y BC (108\_ACCCGCACCTAATTCGTCAAC y 563-GGGTCTTCGATACGGGAGAA). La PCR se realizó en un termociclador (Tech-gene®) y fue validada con ADN extraído de bayas de uva infectadas y micelio de *B. cinerea* como control

positivo, además de cepas de otros hongos y levaduras asociadas a la vid.

Los productos se verificaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV (Green y Sambrook, 2012). Una vez ratificada la recuperación de esporas y la PCR, las técnicas se probaron para la detección de *B. cinerea* en las bayas de vid previamente muestreadas (Fernández *et al.*, 2014).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración y pureza (densidad óptica, DO 230/260) de las extracciones de ADN en los diferentes métodos de recuperación de esporas no mostraron diferencias significativas (ANOVA, Fisher  $p>0.05$ ). Mientras tanto, el valor DO 260/280, que muestra la calidad, fue distinto entre las muestras (ANOVA, Fisher  $p=0.001$ ) y se distinguió el método de agitación. Lo anterior muestra que el alcance de las extracciones de ADN del patógeno pueden ser variables según el hospedero en el que se esté trabajando, ya que, a diferencia de otros modelos como *Alternaria* spp. en tomate, se pueden ejecutar al homogenizar el material infectado, similar al método de recuperación aplicado (Crespo-Sempere *et al.*, 2013).

Por otra parte, la vid posee alto contenido de polifenoles, que pueden interferir en los procesos de extracción (Lodhi *et al.*, 1994). En cuanto a la evaluación de temperaturas de alineamiento, los oligos C729+/- revelaron una única banda de 750 pb a una temperatura de 54°C, contrario a lo mencionado por Rigotti *et al.* (2006), quienes sitúan los BC 108/563 como altamente específicos para detectar a *B. cinerea*. Aunado a esto, se demostró que hongos y levaduras asociados a viñedos no amplificaron ninguna banda con los oligos C729+/-, lo cual detalla mayores propiedades para detectar las cepas de *B. cinerea* en viñedos queretanos. Por otro lado, las cepas morfológicamente identificadas como *B. cinerea* solo resultaron positivas a la amplificación 12 de 17, lo que indica que las

técnicas morfológicas no son veraces en los resultados debido a que esto incluye la variable de la experiencia del personal inmerso en la identificación (Kisluk *et al.*, 2012; Sanzani *et al.*, 2012). Sin embargo, aun cabe la posibilidad de que variaciones en la región a amplificar pudieran alterar este resultado.

Por último, se determinó la incidencia de *B. cinerea* en los viñedos muestreados con las técnicas estandarizadas. En el muestreo de los viñedos, se consideró la variable de posición del racimo o la incidencia de luz (sol y sombra) sobre los frutos, debido a que en diferentes estudios se ha encontrado que *B. cinerea* crece, infecta y produce esporas bajo luz solar (Percival *et al.*, 2015). Pero ya que este no fue un factor determinante sobre la incidencia de *B. cinerea* (ANOVA, Fisher  $p=0.04$ ), se procedió a delimitar el análisis entre los viñedos. En general, los viñedos registraron una baja incidencia de *B. cinerea* del 15%; la más alta fue en VAz ( $p=0.017$ ) seguido de BCo (9,5%) y FRo (10%). Entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.

Las discrepancias mostradas en este estudio pueden ser adjudicadas al manejo general de cada viñedo; por ejemplo, el control cultural que incluye actividades como cortar malezas, podar plantas o la mejora en la disponibilidad de nutrientes intervienen en la disminución de enfermedades (Molitor *et al.*, 2015). Por otro lado, las condiciones climáticas como la humedad y la temperatura juegan un papel determinante en la emergencia de enfermedades producidas por hongos (Williamson *et al.*, 2007), aunque en este caso no se observó ninguna relación con ello.

#### CONCLUSIONES

La aplicación de la PCR en cultivos de vid resultó una herramienta sensible y útil para detectar infecciones latentes de *B. cinerea*. Si bien este estudio muestra un panorama general de lo que se busca emprender, aún se espera que pase algún tiempo para que estas técnicas formen parte de un diagnóstico empleado por los agricultores, en la

búsqueda de una agricultura sostenible que pretende ayudar en la producción de recursos sin dañar el ambiente. A futuro se pretende establecer herramientas aún más sensibles, como la qPCR, que sean cuantitativas para determinar cantidades de patógeno en proporción general y así poder ampliar un panorama de las enfermedades en los cultivos.

#### REFERENCIAS

- Crespo-Sempere A, Estiarte N, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 2013. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 214-220.
- Elmer PAG, Michailides TJ, 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, pp. 243-272.
- Fernández JG, Fernández-Baldo MA, Muñoz C, Salinas E, Raba J, Sanz MI (2014). Detection transposable elements in *Botrytis cinerea* in latent infection stage from symptomless apples. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (7).
- Green MR, Sambrook J (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press New York*.
- Hoffmann S, Batz MB, Morris Jr. JG (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 75, pp. 1292-1302.
- Khazaeli P, Zamanizadeh H, Morid B, Bayat H (2012). Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold in rose greenhouses in central regions of Iran. *International Journal of Agricultural Science and Research* 1, pp. 19-24.
- Kisluk G, Hoover DG, Kneil KE, Yaron S (2012). Quantification of low and high levels of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 45, pp. 36-42.
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12, pp. 6-13.
- Molitor D, Rothmeier M, Behr M, Fischer S, Hoffmann L, Evers D (2015). Crop cultural and chemical methods to control grey mould on grapes. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, 50, 81.
- Pande S, Galloway J, Gaur PM, Siddique KHM, Tripathi HS, Taylor P, MacLeod MWJ, Basandrai AK, Bakr A, Joshi S (2006). *Botrytis* grey mould of chickpea: a review of biology, epidemiology,

and disease management. *Crop and Pasture Science*, 57, pp. 1137-1150.

Percival DC, Sullivan JA, Fisher KH (2015). Effect of cluster exposure, berry contact and cultivar on cuticular membrane formation and occurrence of bunch rot (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) with 3 *Vitis vinifera* L. cultivars. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, 32, 87.

Sanzani SM, Schena L, De Cicco V, Ippolito A (2012). Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. *Postharvest biology and technology*, 68, pp. 64-71.

Wezel A, Casagrande M, Celette F, Vian JF, Ferrer A, Peigné J (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, pp. 1-20.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, pp. 561-580.