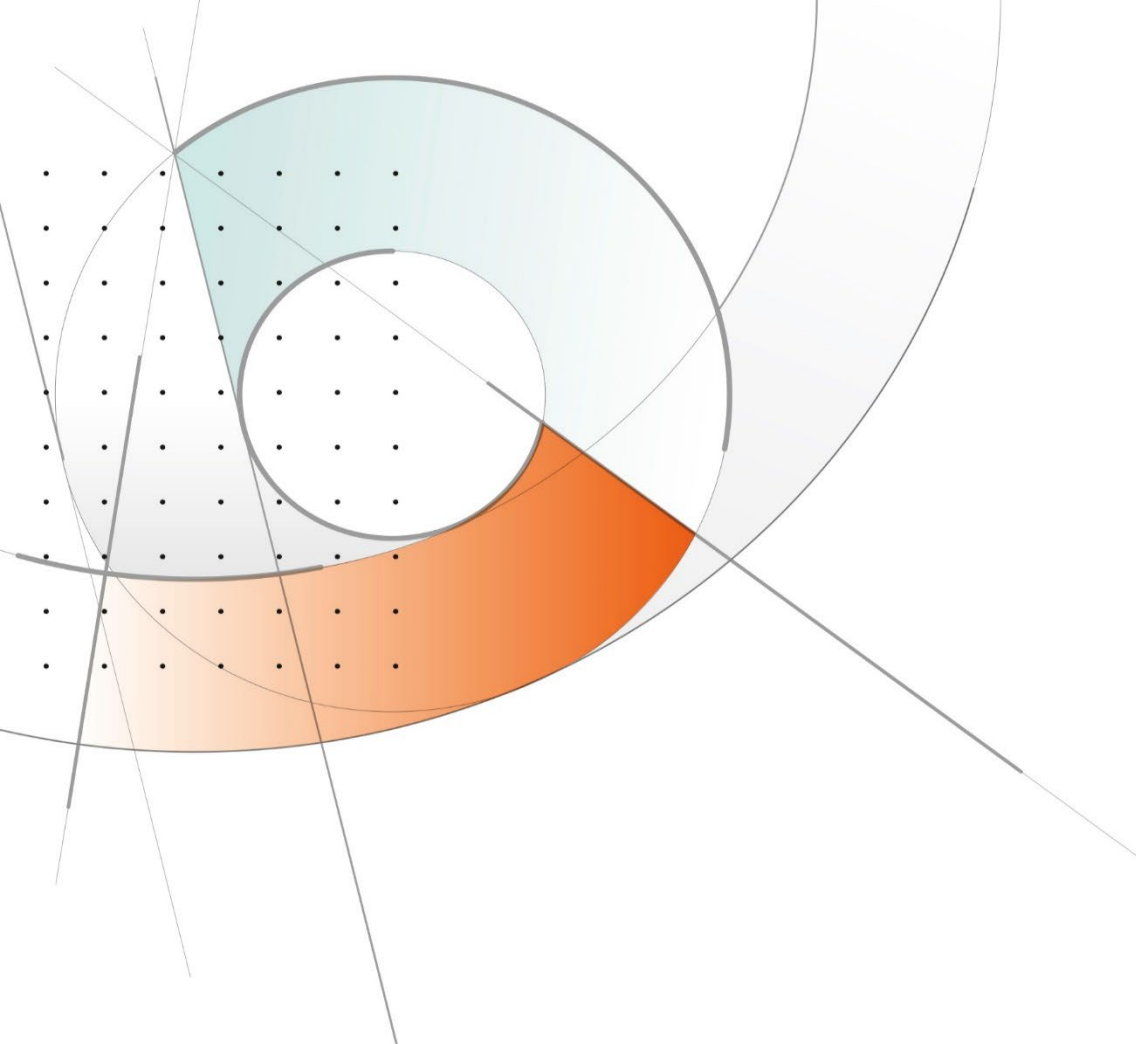




Título del proyecto: *Desarrollo de un sensor portátil para la detección temprana de Botrytis cinerea en el viñedo*

Acrónimo: *BotVid-SENSOR*

Entregable: *E.3.4 Mapa de la incidencia de Botrytis cinerea en cultivos de vid de la Comunidad Valenciana.*



GENERALITAT
VALENCIANA

IVACE+i
INSTITUTO VALENCIANO
DE COMPETITIVIDAD E INNOVACIÓN



Financiado por
la Unión Europea

ENTREGABLE E.3.4 Mapa de la incidencia de *Botrytis cinerea* en cultivos de vid de la Comunidad Valenciana.

1. Introducción.

Durante la campaña de cultivo de vid 2023-2024 se realizó un seguimiento de parcelas de vid en diferentes zonas productoras de la Comunidad Valenciana y diferentes estados de desarrollo para la toma de muestras de hojas y racimos con o sin síntomas de *B. cinerea*. Los objetivos principales eran:

- Obtener aislados de *B. cinerea* y otras posibles especies de *Botrytis* que puedan estar presentes en viñedos de la Comunidad Valenciana.
- Determinar la posible distribución de *B. cinerea* y otras posibles especies de *Botrytis* en la Comunidad Valenciana
- Verificar las metodologías de detección por qPCR de *B. cinerea* en muestras vegetales.
- Localizar y/o disponer de plantas y viñedos afectados que puedan servir para los estudios de validación del sensor de *B. cinerea* que se está desarrollando en el marco del Proyecto (PT4).

2. Establecimiento de un protocolo para el seguimiento y determinación de la presencia de *B. cinerea*

2.1. Toma de muestras y envío al laboratorio

Se recogerán muestras de vid en viñedos de diferentes localizaciones de la Comunidad Valenciana desde el momento de la brotación.

En cada viñedo las muestras consistirán en seleccionar 5 plantas al azar, y en cada una de ellas tomar 5 hojas y 2 racimos con síntomas de Botrytis o no, que se juntarán en una bolsa y constituirán una única muestra. No importa el estado fenológico ni el tamaño de los racimos ni de las hojas.

De cada muestra se anotarán los siguientes datos:

- Localidad
- Geolocalización (si es posible)
- Variedad de vid
- Edad del viñedo
- Fecha de la toma de la muestra

Las bolsas con muestras se guardarán en nevera hasta que se puedan llevar al Laboratorio de Patología Vegetal de la UPV en mano o por mensajería.

Josep Armengol /Patología Vegetal

Edificio 3K, segunda planta, ETSIAMN

Universitat Politècnica de València

Camino de Vera S/N, 46022-Valencia

2.2. Aislamiento de *B. cinerea* en hojas y racimos (UPV)

En el laboratorio de Patología Vegetal de la UPV la muestra se dividirá en 2 partes, una para el aislamiento de *Botrytis* en la UPV y la otra para VALGENETICS, que se guardará en nevera hasta el momento del envío a VALGENETICS.

Para el aislamiento de *Botrytis* de las muestras recibidas, en el caso de que éstas sean sintomáticas se procederá directamente con un protocolo de aislamiento de hongos en medio cultivo PDAS con transferencia posterior de las colonias obtenidas a medio de cultivo PDA.

Sin embargo, lo más frecuente será recibir muestras asintomáticas en las que pueda haber infecciones latentes de *Botrytis*, que es una situación bastante frecuente en el viñedo hasta las fases más avanzadas del cultivo, cercanas a la recolección.

En este caso, submuestras tomadas de hojas y racimos se enjuagarán con agua del grifo durante 3 minutos, se desinfectarán con tres cuartos agua destilada y un cuarto de lejía durante 1,5 minutos para eliminar la microflora epífita y, finalmente, se enjuagarán nuevamente con agua esterilizada. Las hojas y granos de los racimos se colocarán sobre una red metálica montada en una caja de plástico con papel de filtro húmedo colocado en el fondo, de modo que no se toquen entre sí ni con el papel de filtro. Las cajas se cerrarán con tapa o film plástico para mantener una atmósfera saturada y se incubarán a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h durante 10 días. Si se observa el crecimiento de colonias fúngicas, éstas se transferirán a medio de cultivo PDA para su crecimiento y observación.

Todas las colonias obtenidas cuyo aspecto encaje con *Botrytis* spp. seguirán un proceso de obtención de cultivos monospóricos e identificación morfológica y molecular para determinar la especie de *Botrytis*.

2.3. Detección molecular de *B. cinerea* en hojas y racimos (VALGENETICS)

Dado que se trata de una prospección con un alto volumen de material vegetal a muestrear, mayormente constituido por muestras asintomáticas con baja concentración de *B. cinerea*, se sugiere la aplicación de la BIO-PCR como metodología para la detección del hongo.

Esta técnica implica la selección representativa de material vegetal de la muestra, seguida de una breve incubación en un medio de cultivo líquido propicio para el crecimiento fúngico. Posteriormente, se realiza la extracción de ADN de una alícuota del medio de cultivo, donde se presume que estará presente el micelio del hongo objetivo en caso de estar presente. El ADN extraído se utilizará en una PCR a tiempo real. Este enfoque presenta varias ventajas en comparación con la extracción directa de ADN del material vegetal: permite incluir una mayor cantidad de material vegetal en el análisis, lo que aumenta la probabilidad de detección del hongo; proporciona un enriquecimiento fúngico que también incrementa la probabilidad de detección del hongo; y permite obtener una extracción de ADN de mayor calidad, ya que las extracciones directas de ADN a partir de ciertas matrices vegetales como los racimos (que tienen un alto contenido en azúcares, fenoles, etc.), pueden arrastrar una gran cantidad de inhibidores de PCR que podrían interferir en el diagnóstico.

- Selección de muestras vegetales asintomáticas de la viña:

Se seleccionarán 5 plantas de cada viñedo para el estudio. De cada planta, se tomarán 5 hojas y 2 racimos para el análisis de la presencia de *B. cinerea*.

- Preparación de muestras de hojas y racimos:

Para el análisis de las hojas, se seleccionará un fragmento de aproximadamente 1 cm² de cada

una de las 25 hojas. Cada fragmento se colocará en una bolsa de stomacher conteniendo 50-100 ml de medio de cultivo Potato Dextrose Broth (PDB).

En el caso de los racimos, se seleccionarán 5 granos de uva (con raquis) de cada racimo, lo que totaliza 50 granos de uva por viñedo. Estos granos se colocarán en una bolsa de stomacher con 50-100 ml de medio de cultivo PDB.

- Incubación de las muestras:

Las bolsas de stomacher que contienen las muestras se colocarán en una gradilla y se mantendrán en agitación durante 72 horas.

- Recogida de alícuotas y centrifugación:

Pasado el periodo de incubación, se recogerá en un tubo eppendorf una alícuota de 1 ml de medio de cultivo de cada bolsa. Estos tubos se centrifugarán a 6000 rpm durante 5 minutos.

- Extracción de ADN:

Se eliminará el sobrenadante de los tubos eppendorf, quedando únicamente el pellet. A partir de este pellet se realizará una extracción de ADN.

- Análisis mediante PCR a tiempo real:

El ADN extraído se analizará mediante PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman específica para *B. cinerea*.

3. Prospecciones realizadas y resultados.

Se tomaron muestras en un total de 35 parcelas de cultivo de vid en la Comunidad Valenciana. En el Anexo se muestran las características y localización de los viñedos.

Los resultados en cuando a la detección positiva o negativa de *B. cinerea* en las muestras mediante las técnicas clásicas de aislamiento fúngico (UPV) o moleculares (Valegenetics). Se indican en la Tabla 1.

Muestra Nº	Detección de <i>Botrytis</i>		Muestra Nº	Detección de <i>Botrytis</i>	
	UPV	Valgenetics		UPV	Valgenetics
1	-	-	21	+	-
2	-	-	22	+	-
3	-	-	23	+	-
4	-	-	24	-	-
5	-	-	25	-	+ (Cq=34.01)
6	-	-	26	-	+ (Cq=29.1)
7	-	-	27	-	-
8	-	-	28	-	+ (Cq=34.75)
9	+	-	29	-	-
10	-	-	30	-	-
11	-	-	31	-	-
12	-	-	32	-	+ (Cq=22.23)
13	-	-	33	-	-
14	-	-	34	-	-
15	+	+ (Cq=23.09)	35	-	-
16	-	-			
17	-	+ (Cq=30.79)			
18	-	+ (Cq=32.89)			
19	-	-			
20	+	-			

+ = Muestra positiva / - = Muestra negativa

Los resultados obtenidos muestran que la detección de *B. cinerea* variaba según el método utilizado. La detección por la metodología clásica de aislamiento (UPV) permitió detectar seis muestras positivas, mientras que la detección molecular (Valgenetics) permitió la detección de *B. cinerea* en siete de las muestras estudiadas. La Muestra 15 fue la única muestra en la que se obtuvo una coincidencia entre los dos métodos de muestreo.). Todas las colonias fúngicas obtenidas por la metodología de aislamiento de la UPV se identificaron como pertenecientes a la especie *B. cinerea*, no detectándose otras especies de *Botrytis*.

El viñedo de la muestra 15 se seleccionó para la tarea de “Determinación de tejidos y periodo de muestreo óptimo de material vegetal en campo” (PT4.1). en ella se realizó un muestreo

adicional en el mes de julio de 2024 en el que se seleccionaron hojas y racimos de 10 plantas escogidas al azar. Estas muestras se analizaron nuevamente en la UPV y en Valgenetics con las metodologías mencionadas anteriormente. Pero, en este muestreo no se consiguió detectar *B. cinerea* en ninguna de las muestras analizadas y con ninguna de las dos metodologías utilizadas.

La detección de *B. cinerea* en las muestras estudiadas ha sido muy escasa, en correspondencia con las desfavorables condiciones climáticas para la enfermedad de la campaña de cultivo 2023-24, en la que las condiciones de sequía prolongada por falta de lluvias determinaron que todas las muestras analizadas fueran asintomáticas. Esto ha hecho que sea muy difícil encontrar viñedos en los que sea posible detectar el hongo dificultando muchas de las tareas previstas en el Proyecto. Igualmente, los bajos niveles de infección observados han contribuido a que los resultados obtenidos con las dos metodologías no siempre coincidan. Por un lado, un nivel bajo de infección implica una distribución irregular del hongo en el material vegetal que comprende la muestra, por lo que podría ser que al subdividirse la muestra para analizarla por las dos metodologías no fueran las dos partes iguales en cuanto a carga fúngica. Por otra parte, cinco de las siete muestras positivas detectadas por técnicas moleculares han presentado niveles de infección muy bajos (Cq cercanos a 30 a superiores). Teniendo en cuenta que las técnicas de biología molecular suelen tener una sensibilidad muy alta, podría ser que en esas muestras la carga fúngica de *B. cinerea* fuera tan baja que no se haya podido aislar por la metodología clásica.



RECOGIDA DE MUESTRAS

MUESTREO DE VID

Clasificación y localización de las 35 muestras de vid recogidas durante los muestreos de mayo y junio para el proyecto BotVid

Fechas de muestreo: Mayo - Junio

Recogida de muestras Valencia (13/05/2024)

Muestra 1

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	138 – Godelleta. Pantano seco	6	170	Moscatel
Referencia Catastral	46138A006001700000AY			
Coordenadas	39°26'04.6"N 0°37'20.5"W			



Muestra 2

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	113 – Chiva. Miralcampo	26	286	Macabeo
Referencia Catastral	46113A026002860000RG			
Coordenadas	39°27'41.8"N 0°36'01.9"W			



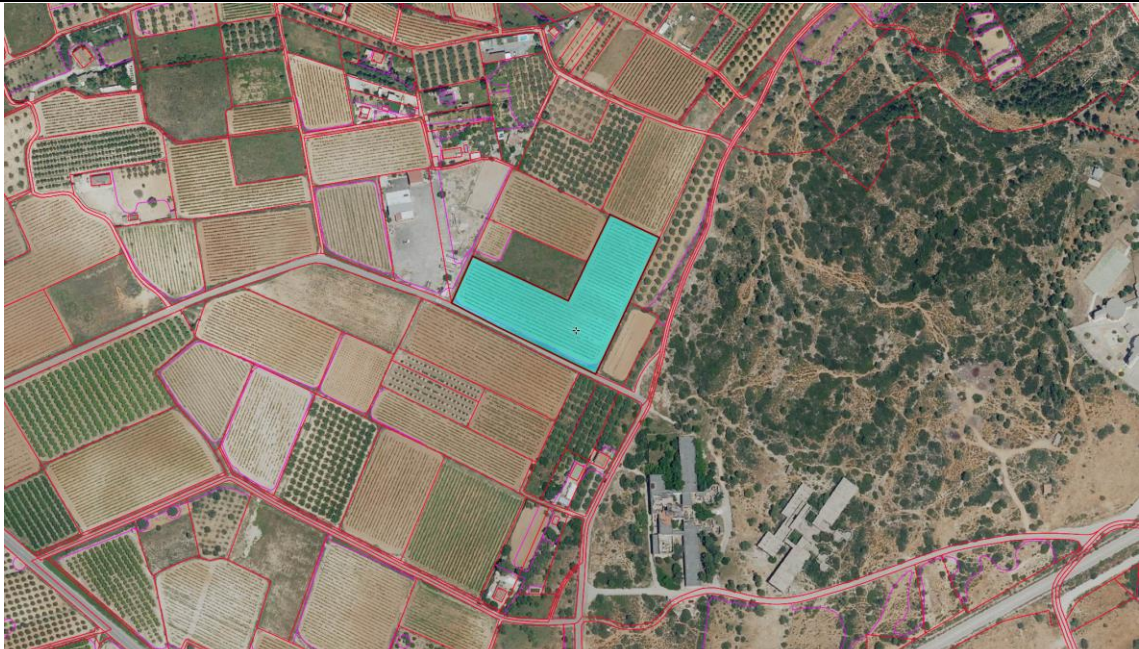
Muestra 3

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	111 – Chestre. Torreta	31	1502	Monastrell
Referencia Catastral	46111A031015020000LT			
Coordenadas	39°29'09.3"N 0°40'07.1"W			



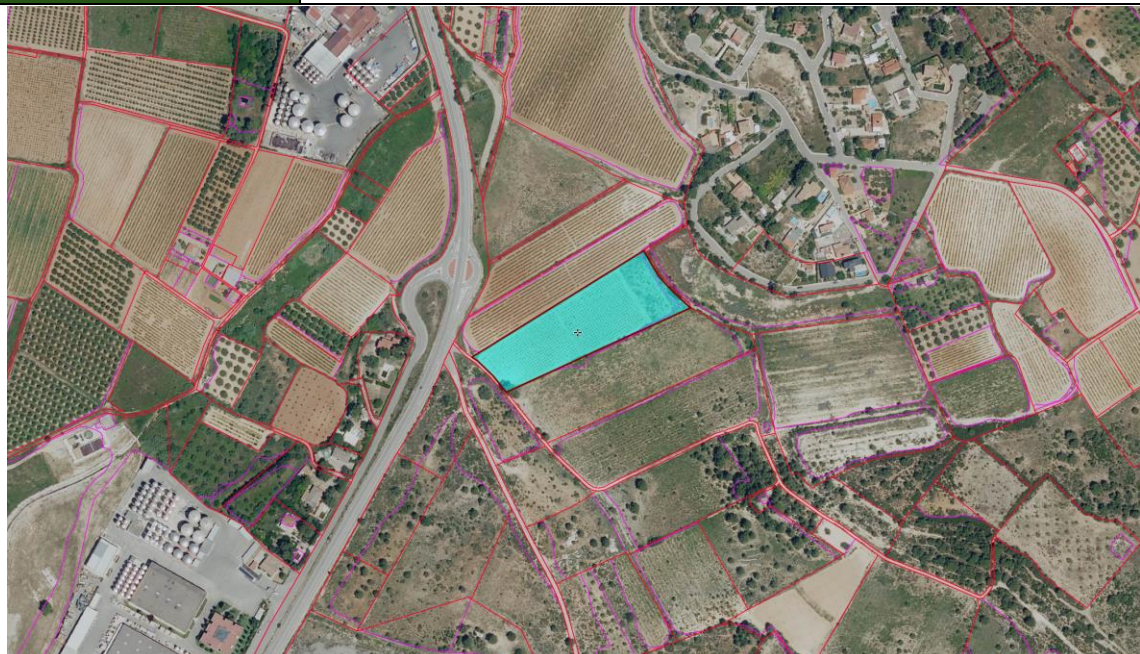
Muestra 4

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	111 – Cheste. Garrama	31	1168	Bobal
Referencia Catastral	46111A031011680000LU			
Coordenadas	39°29'09.5"N 0°39'45.5"W			



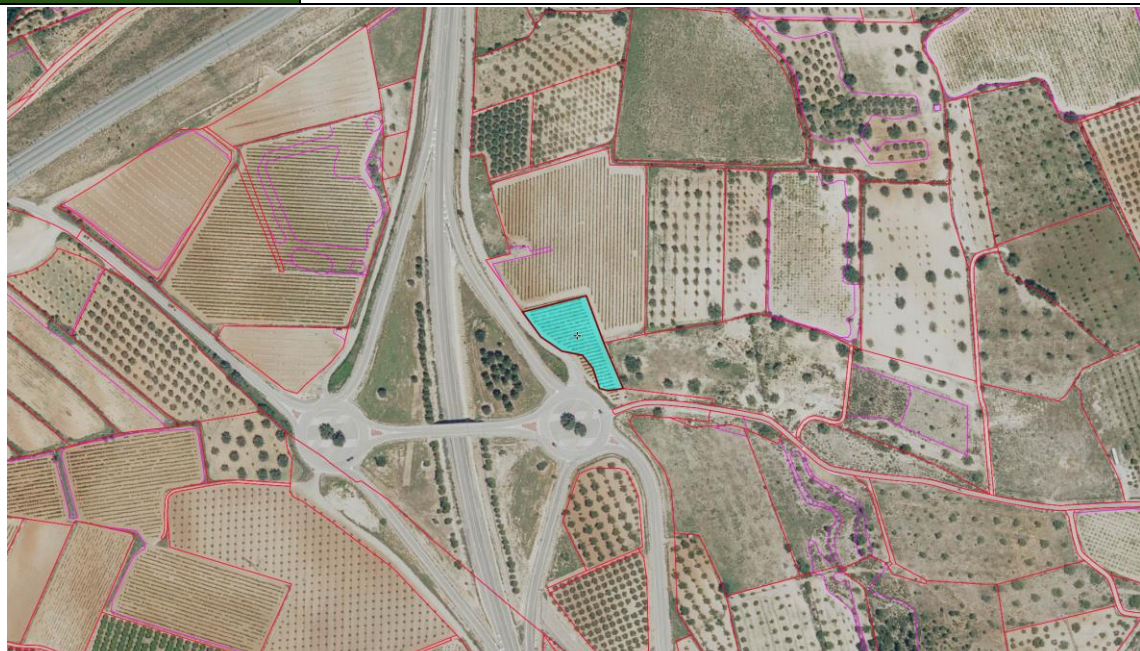
Muestra 5

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	113 – Chiva. Cañada Vergara	13	668	Moscatel
Referencia Catastral	46113A013006680000RE			
Coordenadas	39°28'40.2"N 0°41'27.7"W			



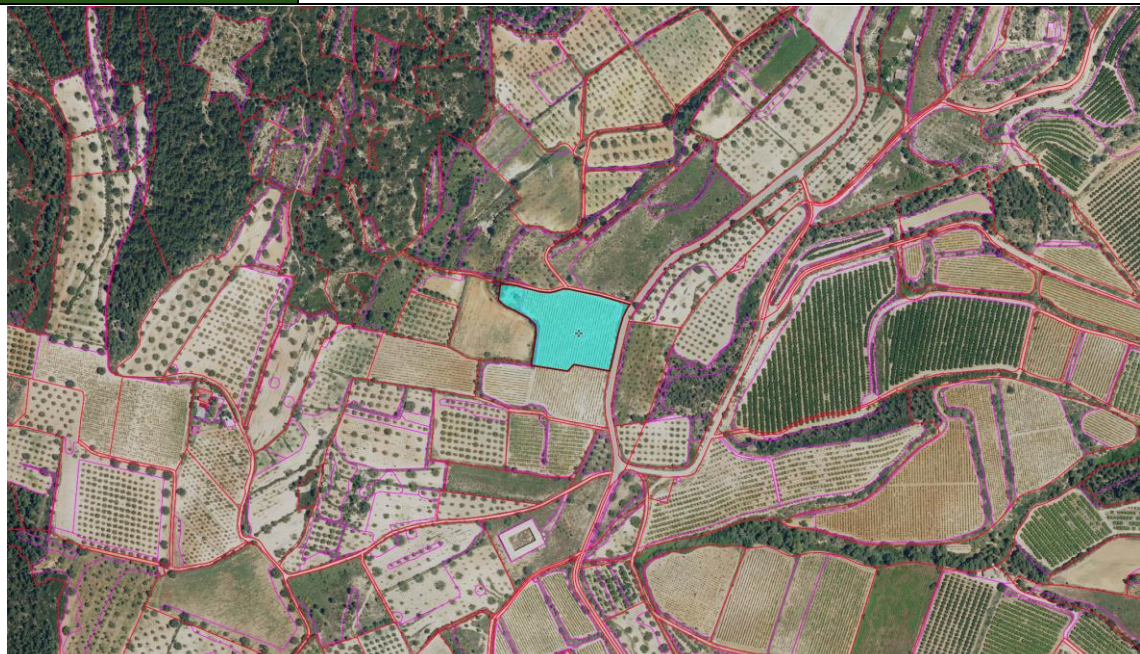
Muestra 6

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	113 – Chiva. Alto Mancero	15	69	Macabeo
Referencia Catastral	46113A015000690000RK			
Coordenadas	39°27'41.4"N 0°41'38.5"W			



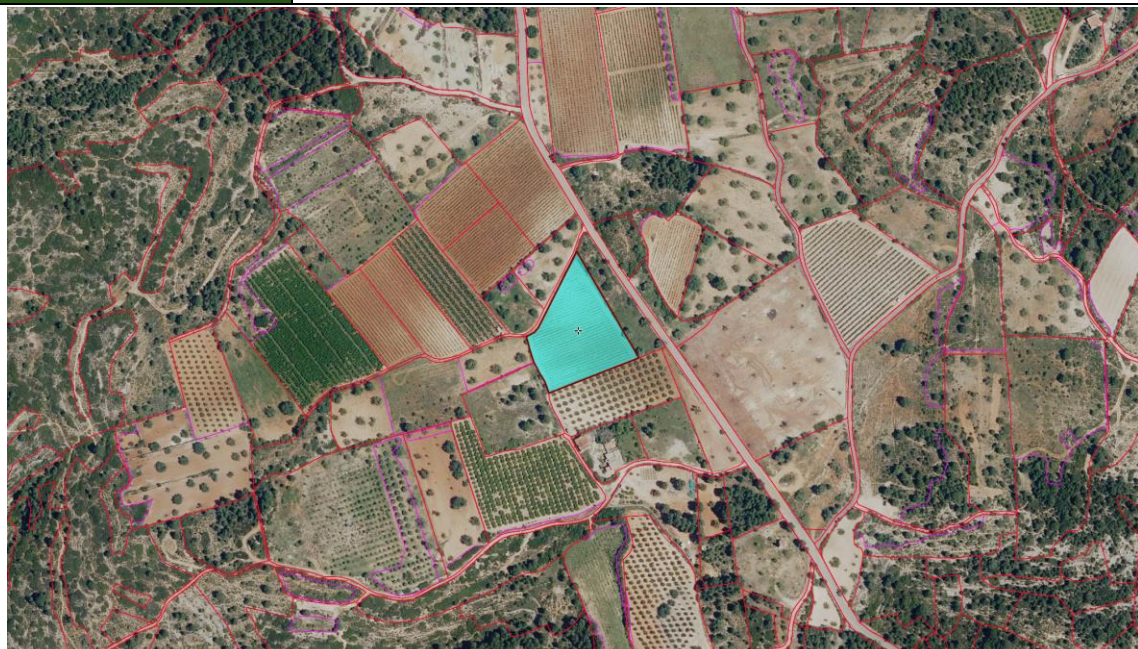
Muestra 7

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	113 – Chiva. Pellicera	36	405	Moscatel
Referencia Catastral	46113A036004050000RY			
Coordenadas	39°25'44.9"N 0°43'53.9"W			

An aerial photograph of a vineyard in Chiva, Valencia. The image shows a complex arrangement of agricultural plots, some of which are outlined in red and purple. A central plot is highlighted in cyan. The surrounding area includes fields, roads, and some forested areas. The overall scene is a detailed view of the vineyard's layout and surrounding landscape.

Muestra 8

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	250 - Turis. Viñamalata	2	227	Merseguera
Referencia Catastral	46250A002002270000QB			
Coordenadas	39°24'06.2"N 0°43'11.0"W			



Muestra 9

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	250 - Turis. Viñamalata	4	164	Merseguera
Referencia Catastral	46250A004001640000QK			
Coordenadas	39°24'10.5"N 0°43'10.2"W			



Muestra 10

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	215 – Requena. Gavilanes	33	99	Tempranillo
Referencia Catastral	46215A033000990000QL			
Coordenadas	39°28'48.6"N 1°00'54.8"W			



Muestra 11

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	215 – Requena. Estación	33	109	Tempranillo
Referencia Catastral	46215A033001090000QI			
Coordenadas	39°28'32.6"N 1°00'43.5"W			



Muestra 12

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	215 – Requena. Quebradas	49	29	Bobal
Referencia Catastral	46215A049000290000QE			
Coordenadas	<u>39°28'52.8"N 1°08'56.6"W</u>			



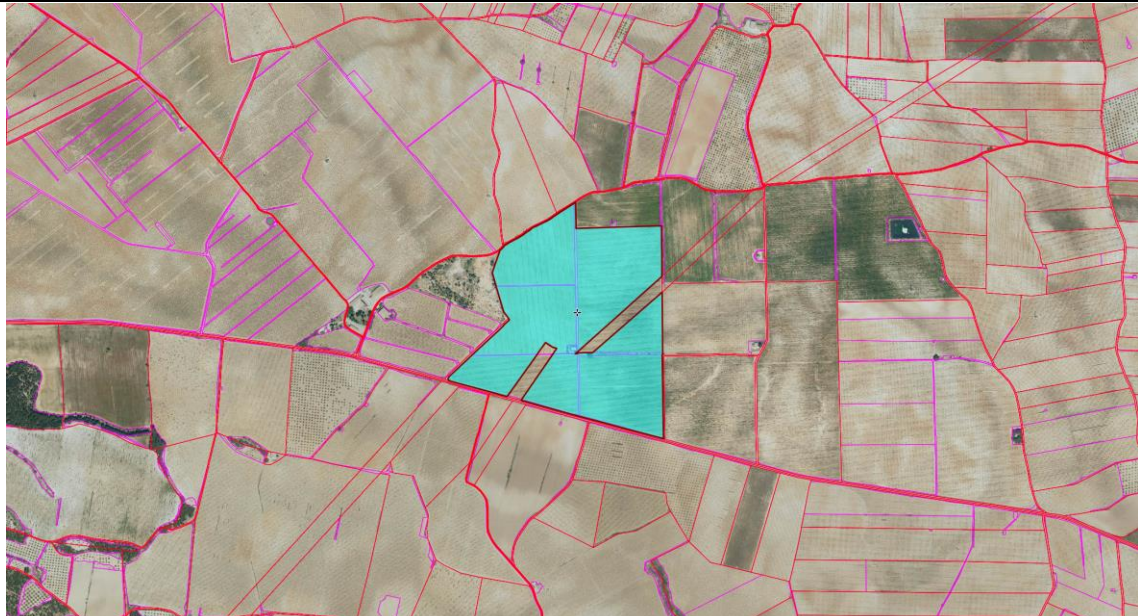
Muestra 13

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	256 – Venta del moro. Carrascalejo	23	96	Garnacha
Referencia Catastral	46256A023000960000WW			
Coordenadas	39°28'58.4"N 1°17'59.0"W			



Recogida de muestras Valencia (14/05/2024)

Muestra 14

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	256 – Venta del moro. El Olivar	23	2	Garnacha
Referencia Catastral	46256A023000020000WB			
Coordenadas	<u>39°29'15.3"N 1°19'20.0"W</u>			
				

Muestra 15

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Superficie (ha)
46 - Valencia	256 – Venta del moro. Sevilluela	15	87	Tempranillo
Referencia Catastral	46256A015000870000WA			
Coordenadas	39°30'01.3"N 1°23'58.7"W			



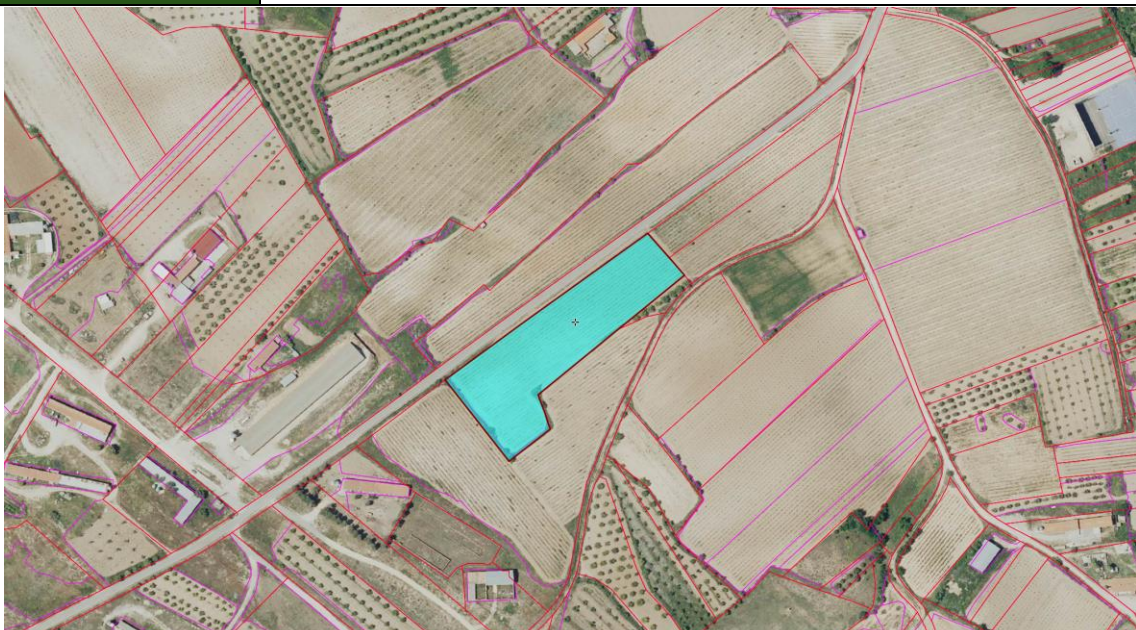
Muestra 16

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	261 – Villargordo del Cabriel. Camino la Venta	9	11	Bobal
Referencia Catastral	46261A009000110000PM			
Coordenadas	39°32'00.6"N 1°25'59.2"W			



Muestra 17

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	131 – Fuenterrobles. La Pedriza	9	208	Tempranillo
Referencia Catastral	46131A009002080000YI			
Coordenadas	39°34'55.9"N 1°22'16.0"W			



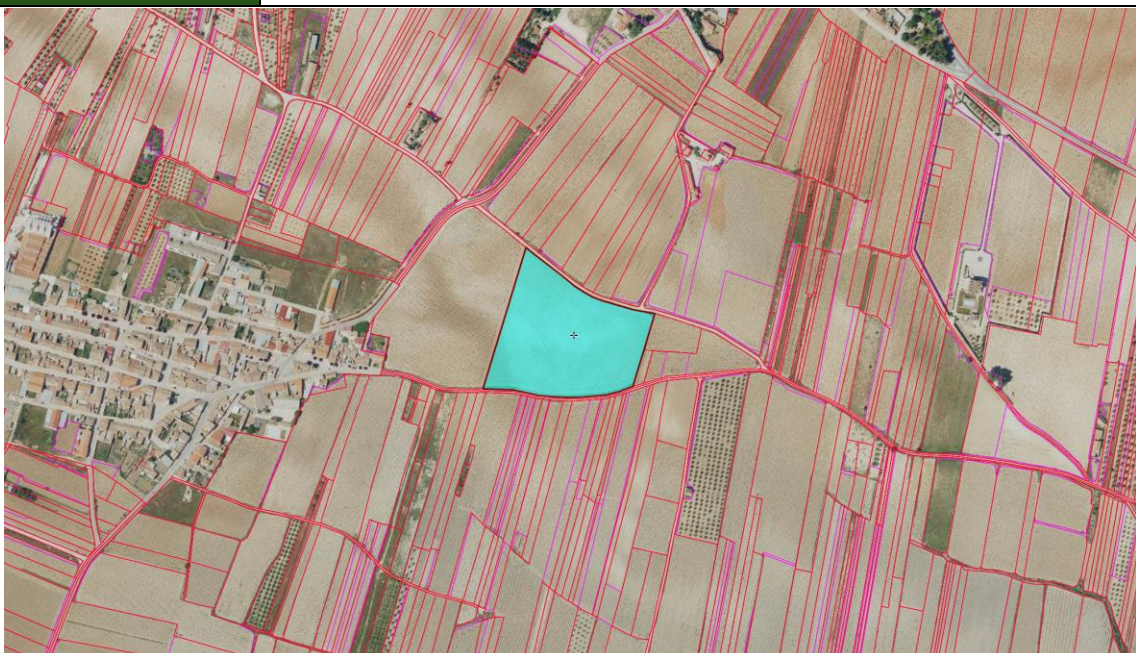
Muestra 18

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	251 – Utiel. El Ardal	20	696	Bobal
Referencia Catastral	46251A020006960000TR			
Coordenadas	39°33'58.3"N 1°16'38.3"W			



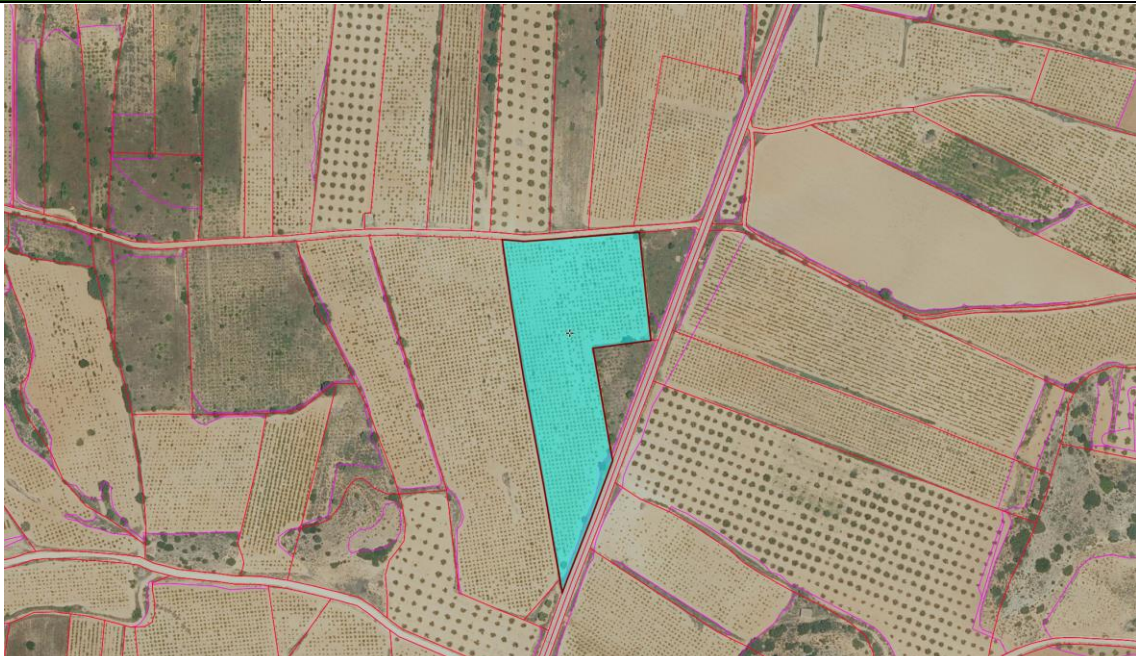
Muestra 19

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	251 – Utiel. Carasoles	22	330	Bobal
Referencia Catastral	46251A022003300000TR			
Coordenadas	39°35'27.8"N 1°16'26.2"W			



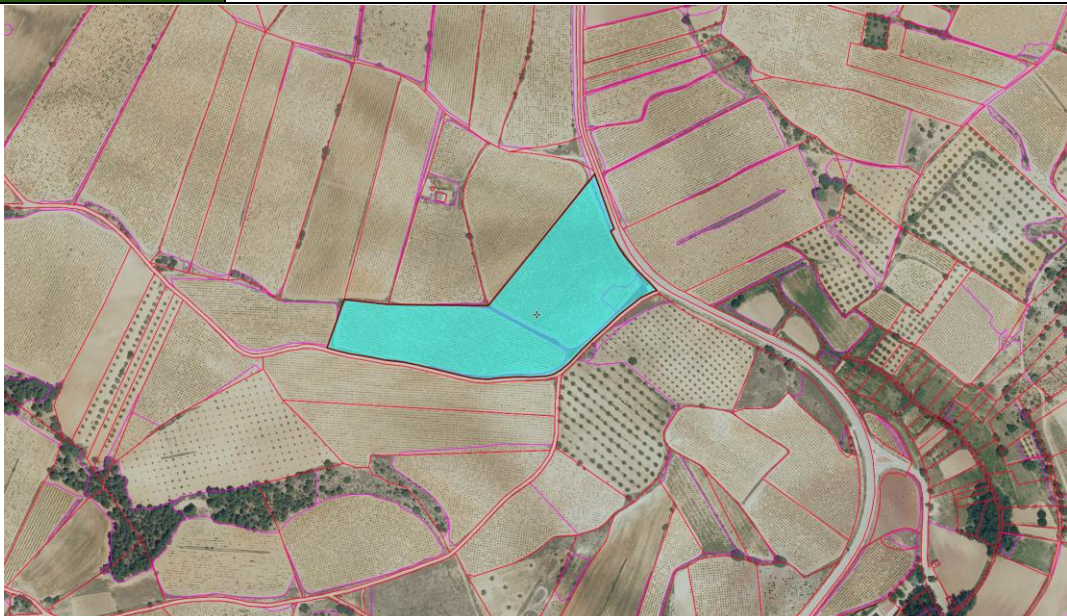
Muestra 20

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	215 – Requena. Corral de Navarro	142	164	Bobal
Referencia Catastral	46215A142001640000PJ			
Coordenadas	39°31'55.9"N 1°13'18.3"W			



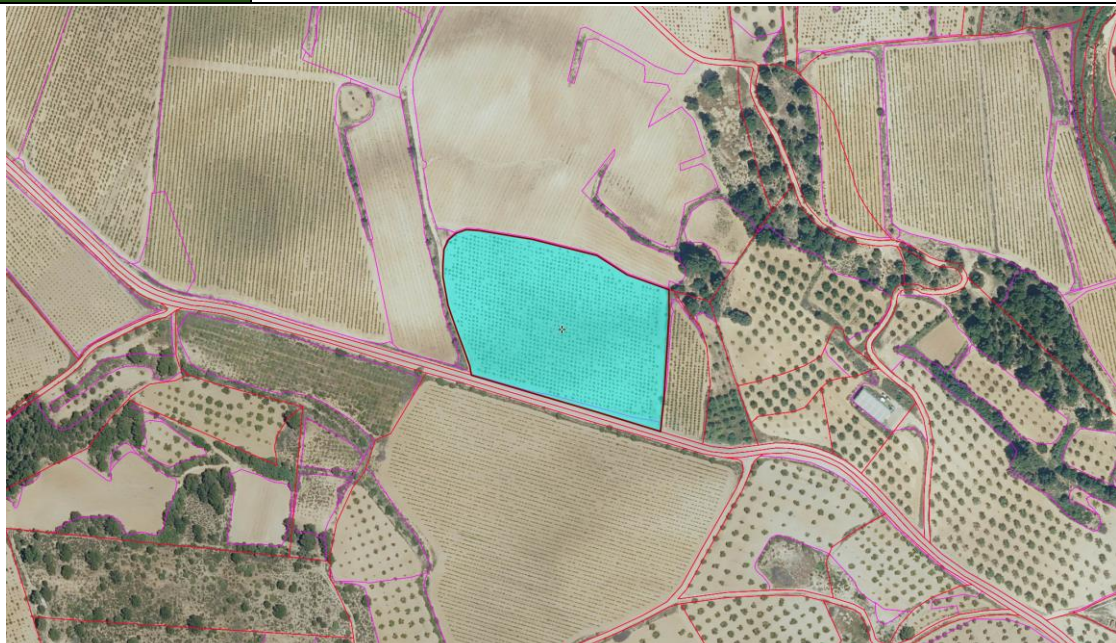
Recogida de muestras Valencia (14/06/2024)

Muestra 21

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	256 - Venta del Moro	4	304	Garnacha
Referencia Catastral	46256A004003040000WH			
Coordenadas	39°31'36.1"N 1°21'55.1"W			
				

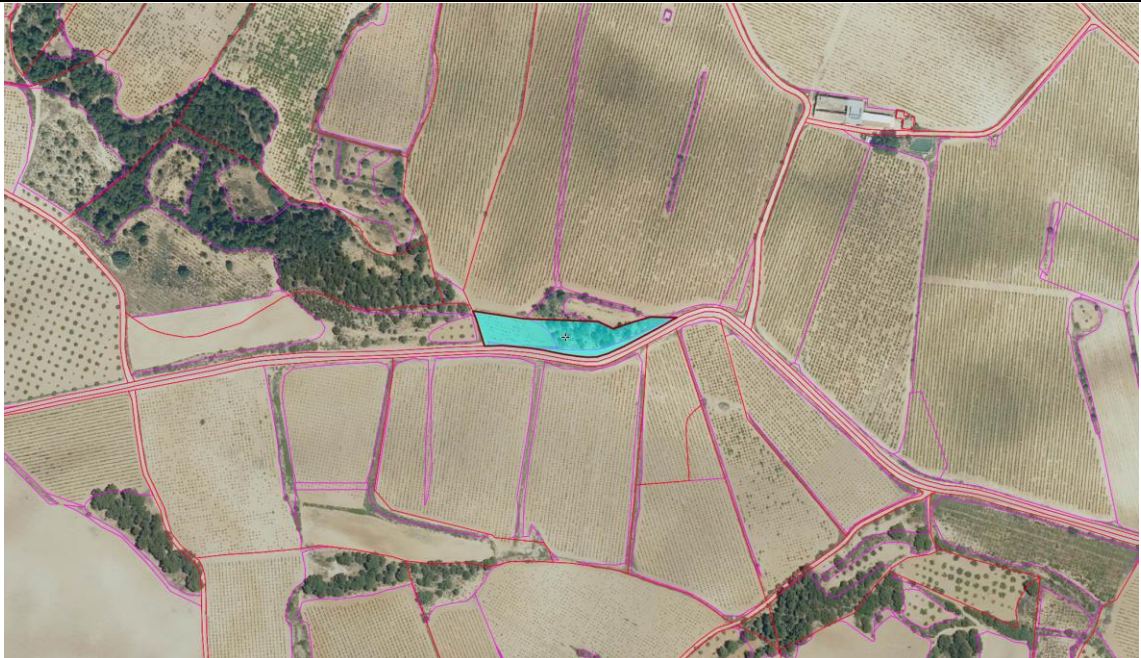
Muestra 22

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	256 – Venta del Moro	16	205	Bobal
Referencia Catastral	46256A016002050000WK			
Coordenadas	39°29'17.1"N 1°22'10.1"W			



Muestra 23

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	256 – Venta del Moro	16	107	Tempranillo
Referencia Catastral	46256A016001070000WO			
Coordenadas	39°29'21.2"N 1°22'31.4"W			

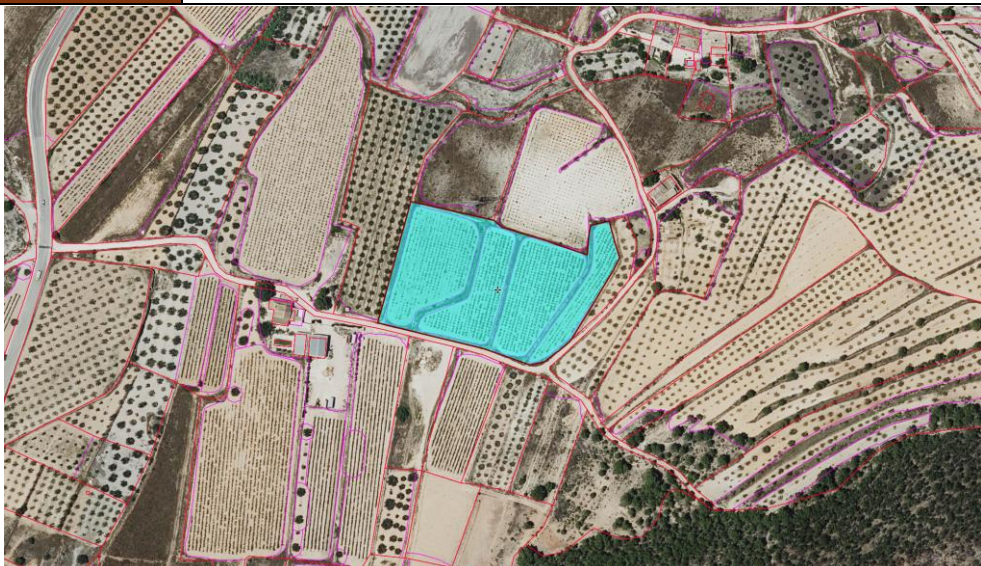


Recogida de muestras Alicante (13/06/2024)

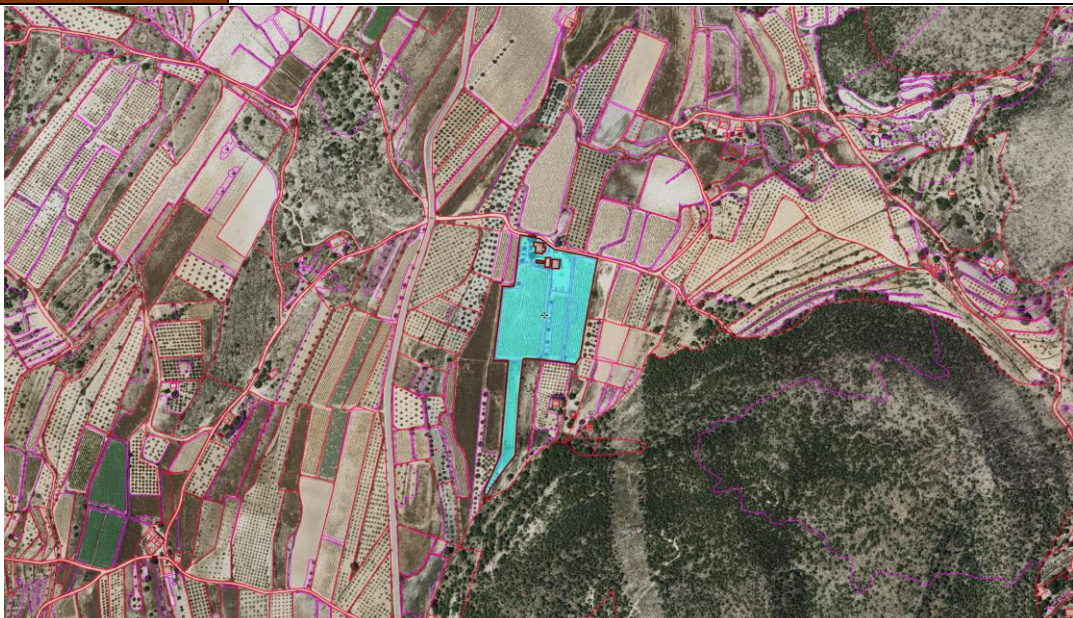
Muestra 24

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	89 – Monovar/Monover	35	99	Moscatel Alejandría
Referencia Catastral	03089A035000990000ME			
Coordenadas	38°23'45.6"N 0°54'45.8"W			
				

Muestra 25

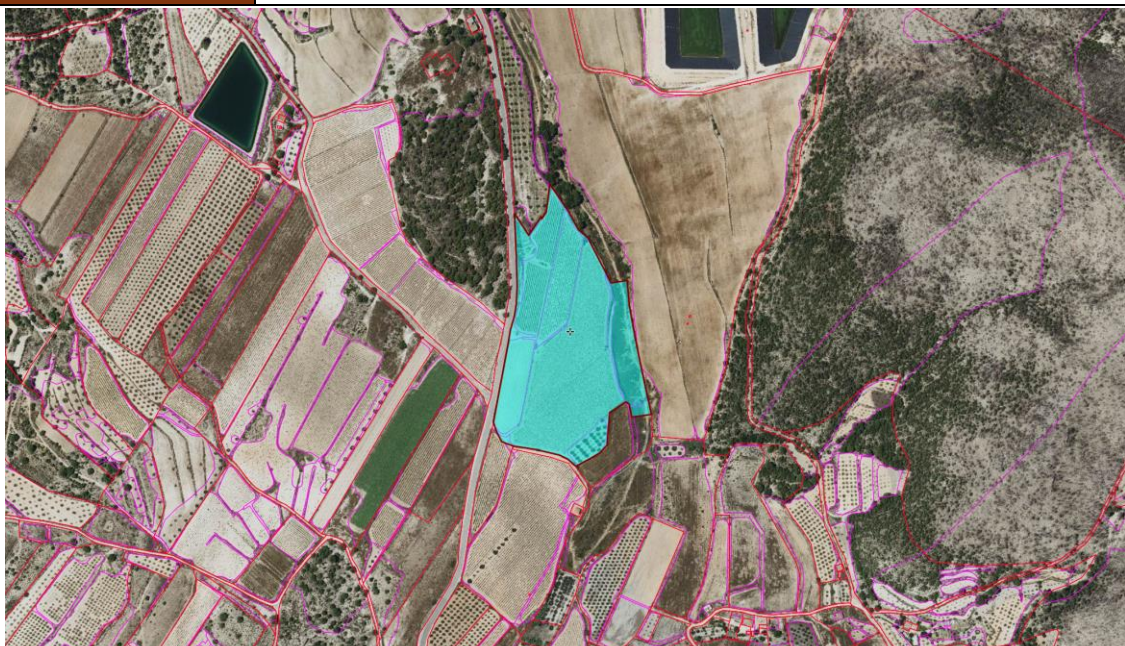
Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	89 – Monovar/Monover	35	85	Cariñera
Referencia Catastral	03089A035000850000ML			
Coordenadas	38°23'46.4"N 0°54'44.8"W			
				

Muestra 26

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	89 – Monovar/Monover	35	101	Garnacha
Referencia Catastral	03089A035001010000MS			
Coordenadas	38°23'46.2"N 0°54'48.7"W			
				

Muestra 27

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	89 – Monovar/Monover	35	43	Monastrell
Referencia Catastral	03089A035000430000MW			
Coordenadas	38°24'02.9"N 0°54'52.4"W			



Muestra 28

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	89 – Monovar/Monover	37	151	Cabernet
Referencia Catastral	03089A037001510000MS			
Coordenadas	38°24'56.8"N 0°55'50.4"W			



Muestra 29

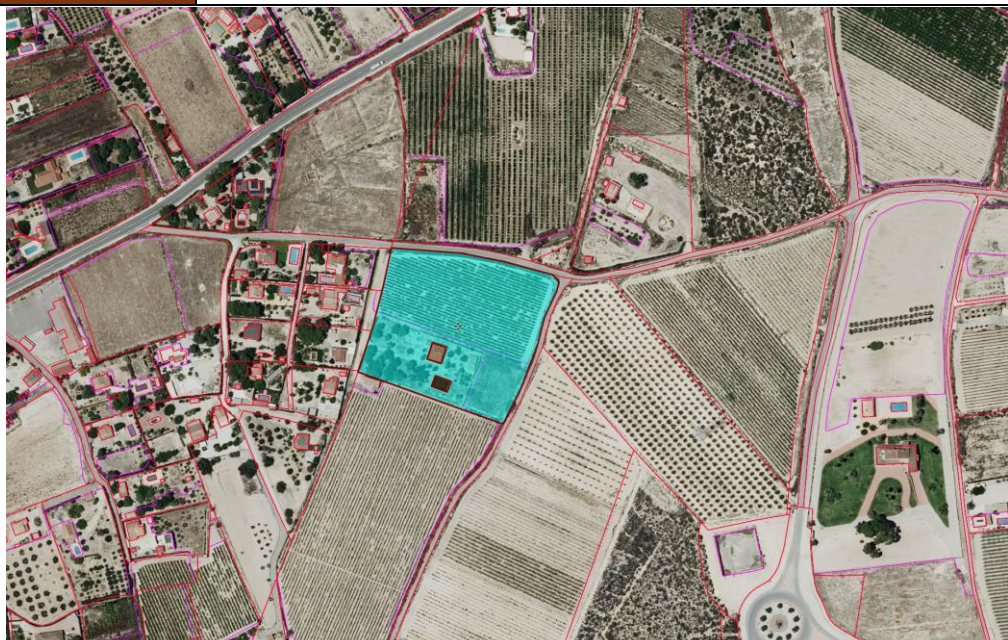
Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	93 – Novelda	29	89	Monastrell
Referencia Catastral	03093A029000890000RP			
Coordenadas	<u>38°22'36.4"N 0°47'09.3"W</u>			



Muestra 30

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	93 – Novelda	38	29	Tempranillo
Referencia Catastral	03093A038000290000RZ			
Coordenadas	38°22'44.1"N 0°47'11.7"W			

Muestra 31

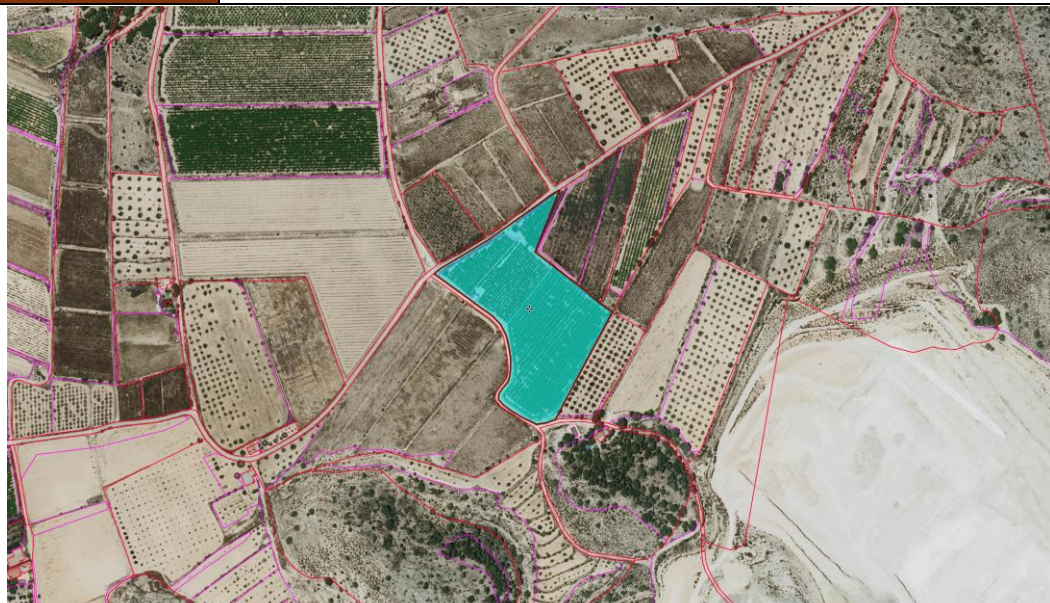
Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	88 – Monforte del Cid	6	193	Moscatel Alejandría
Referencia Catastral	03088A006001930000LZ			
Coordenadas	38°23'51.2"N 0°44'03.2"W			
				

Muestra 32

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	19 – Aspe	34	26	Garnacha
Referencia Catastral	03019A034000260000AE			
Coordenadas	38°20'36.0"N 0°50'07.7"W			



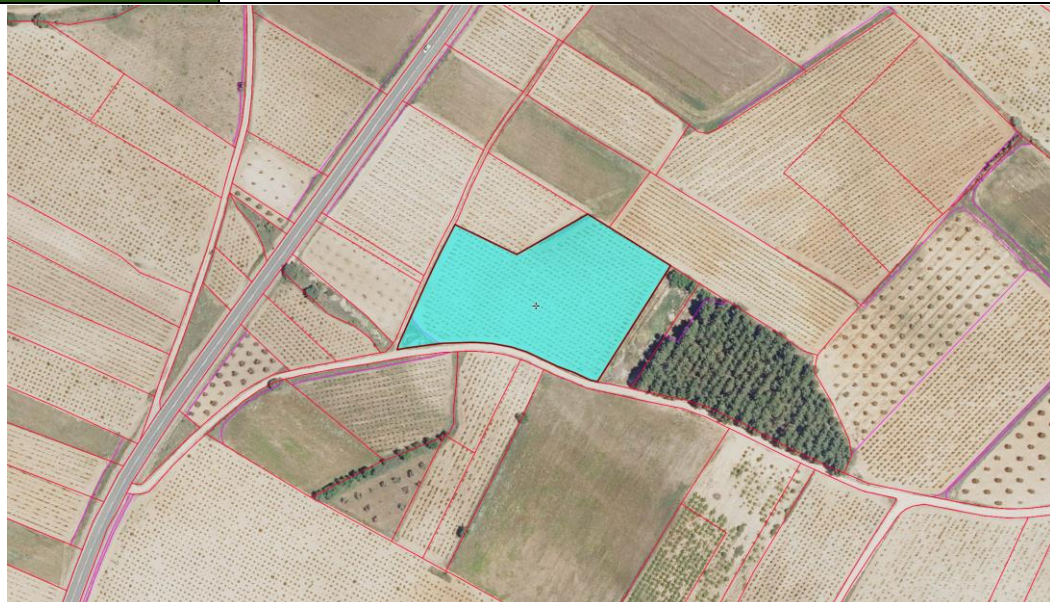
Muestra 33

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
3 - Alicante	19 – Fondó de les Neus	4	58	Bobal
Referencia Catastral	03077A004000580000PP			
Coordenadas	38°19'09.9"N 0°50'33.6"W			
				

Recogida de muestras Valencia (02/07/2024)

Muestra 34

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	251 – Utiel. Loma Alta	1	422	Bobal
Referencia Catastral	46251A001004220000TF			
Coordenadas	39°40'45.1"N 1°15'17.5"W			



Muestra 35

Provincia	Municipio	Polígono	Parcela	Tipo de uva
46 - Valencia	251 – Utiel. Caña Latorre	7	203	Tempranillo
Referencia Catastral	46251A007002030000TW			
Coordenadas	39°38'19.4"N 1°16'14.7"W			

