

EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS PARA REDUCIR EL USO DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN VITICULTURA

Sandra Rainieri¹, Ana Maria Díez-Navajas², Ramón Barrio³, Alejandro Barranco¹

¹AZTI. Investigación Alimentaria. Parque Tecnológico de Bizkaia. Edif. 609. 48160 Derio (Spain).

²NEIKER-Tecnalia Dept. Plant Protection, Campus agroalimentario de Arkaute. Apdo. 80. 01080, Vitoria (Spain)

³UPV/EHU Dept. Analytical Chemistry, University of the Basque Country, Vitoria (Spain)

srainieri@azti.es

Los fungicidas se encuentran entre los productos químicos más ampliamente utilizados para el control en los viñedos de patógenos de origen fúngica que provocan enfermedades devastadoras, tales como el mildiu y el oídio. Estas enfermedades son difíciles de controlar, especialmente en áreas endémicas, donde aparecen en todas las fases de crecimiento y deben ser tratadas reiterativamente. Estas condiciones favorecen la resistencia en los patógenos (Corio-Costet et al, 2011; Dufour et al, 2011), lo que implica la necesidad de dosis más altas en los tratamientos posteriores, el uso de fungicidas más agresivos, una mayor exposición del personal y un aumento de la presencia de sustancias tóxicas en uvas, mostos y vinos, así como en el ambiente que lo circunda (suelo y agua, por ejemplo).

Los gobiernos están exigiendo esfuerzos para reducir los insumos de pesticidas en los cultivos, mediante el uso de técnicas alternativas al rociado o la reducción del número de aplicaciones. En este contexto, el Proyecto FITOVID - Implementación de Estrategias y Demostrativas e Innovadoras para reducir el uso de productos fitosanitarios en viticultura (www.fitovid.eu) propone un enfoque multi-estrategico encaminado a reducir el número de aplicaciones de productos fitosanitarios contra mildiu y oídio en áreas endémicas. Las estrategias estudiadas durante el proyecto son: 1) Monitoreo de parámetros meteorológicos y fenológicos; 2) monitoreo de la concentración de esporas; 3) uso de diferentes tipos de fitoquímicos; 4) detección automática antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad; 5) Eficiente proceso de aplicación mediante una maquinaria bien calibrada e inspecciones adecuadas de la misma.

En este artículo nos centraremos en el análisis del impacto de las estrategias aplicadas para la reducción de fungicidas mediante 1) evaluación de productos fitosanitarios en suelo y agua, así como en uvas, mostos y vinos; y 2) evaluación de los efectos que las uvas, mosto y vinos podrían producir en la expresión de genes en el modelo vertebrado pez cebra (*Danio rerio*) y relacionarlos con el tratamiento o con otros parámetros.

Materiales y Métodos

Tratamientos y esquema experimental

Se utilizaron dos viñedos experimentales con una superficie de 1 hectárea, en dos áreas endémicas de mildiu y oidio (área Atlántica y Mediterránea, respectivamente) para la aplicación de los diferentes tratamientos y para estudiar las diferentes estrategias de aplicación durante la temporada de crecimiento 2015. El viñedo que representa la parcela atlántica, endémica de mildiu, se encuentra en Aia, en la zona DOP de Getaria, en el norte de España. Este viñedo produce un típico vino blanco conocido como Txakoli. El viñedo que representa la parcela mediterránea, endémica de oidio, se encuentra en Laguardia, en la región DOP de Rioja; este viñedo produce prestigiosos vinos tintos españoles. Cada viñedo se dividió en varias subparcelas que fueron sometidas a un programa de tratamiento diferente para el control de la enfermedad. Cada tratamiento se repitió en 3 parcelas diferentes. En particular, el viñedo de Aia se dividió en 12 subparcelas en 2015, y el viñedo Laguardia en 15 subparcelas. La Tabla 1 muestra los programas de tratamiento aplicados en cada subparcela en cada viñedo.

Tabla 1. Tratamientos aplicados en cada subparcela en cada una de las regiones endémicas.

Área endémica para mildiu (Aia)		Zona endémica para oidio (Laguardia)	
Sub-parcela n.	Tratamiento	Sub-parcela.	Tratamiento
1, 7, 12	Ningún tratamiento	1, 7, 11	Ningún tratamiento
2, 6, 10	Criterio del viticultor, fungicidas convencionales	2, 6, 13	Fitoquímicos para producción ecológica
3, 5, 9	Fitoquímicos para producción ecológica	3, 9, 12	Emisión de riesgo por estación meteorológica, fungicidas convencionales
4, 8, 11	Emisión de riesgo por estación meteorológica, fungicidas	4, 8, 15	Criterio del viticultor, fungicidas convencionales
		5, 10, 14	Sumatoria del grado-día y fenología, fungicidas convencionales

Los fitoquímicos utilizados para el control del mildiu en Aia fueron los siguientes: mancozeb, folpet, oxiclورو de cobre, cymoxanil, dimethomorph, fosetil Al, metalaxil, benalaxil, ciazofamida, iprovalicarb. Los utilizados para el área endémica de oidio (Laguardia) fueron: azufre, penconazol, tebuconazol, triadimenol, piraclostribina, metiram, metrafenona, boscalida, quinoxifeno, metildiofosfato. Los fitoquímicos para la producción ecológica fueron para el área endémica de mildiu:

sulfato cuprocal, cobre con ácido glucónico y galacturónico o una mezcla de carbonato de calcio, hierro, óxido de potasio y sílice y una mezcla de extractos vegetales. Para el área de oidio fueron: azufre a diferentes concentraciones y extractos vegetales.

Análisis químico

Las concentraciones residuales de productos fitosanitarios se detectaron en agua, suelo, uvas y vinos principalmente por LC-MS QQQ con algunas excepciones; por ejemplo, Fosteyl AI fue detectado por LC-MS single Q, Mencozeb y Metiram por GC-MS y Sulphur y cobre por ICP-MS. Cada muestra tuvo que someterse a un protocolo de extracción especial antes del análisis químico. Para los pesticidas ecológicos, la extracción dispersiva usando el método QuEChERS se usó en mostos, uvas y vinos; mientras que para la extracción de azufre y cobre, se utilizó la extracción asistida por microondas (MWAE) en todas las matrices. Los procedimientos de extracción están descritos en Lemos et al. (2016).

Efectos en embriones de pez cebra

Los embriones de pez cebra de 3 días después de la fecundación se expusieron a diferentes concentraciones de extractos obtenidos de uvas, mostos y vinos provenientes de cada subparcela, que representaban así cada tipo de tratamiento. Se seleccionaron con esta prueba las concentraciones que no causaron toxicidad aguda. Grupos de 25 embriones fueron expuestos por triplicado a cada muestra durante 48 horas. Las exposiciones se realizaron en una incubadora a 27 ° C. Al final de la exposición, los embriones se recogieron con liofilización en nitrógeno líquido y se usaron para la extracción de ARN. El ARN se extrajo con TRIZOL siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ARN se determinó usando un BioAnalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). Las reacciones de transcripción inversa se llevaron a cabo usando 20 ng de ARN total usando un kit de reactivos de transcriptasa inversa TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 25°C durante 10 minutos, 48°C durante 30 minutos y 95°C durante 5 minutos. El cDNA correspondiente se usó como template para qRT-PCR. La PCR cuantitativa se llevó a cabo con un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Alemania).

Se estudiaron tres genes; *cyp1a1* que codifica una enzima que pertenece a la familia del citocromo P450, la codificación de *gstp1* para la glutatión S transferasa ambas enzimas detoxificantes y la codificación de *Il1β* para la interleucina 1β implicada en la respuesta inmune. Cada reacción se realizó en una solución de 10 µL, que contenía 300 µM de cada par de cebadores (Tabla 2), 5 µL de la mezcla maestra SYBR Green PCR (Roche) y 4 µL del ADNc obtenido en la etapa anterior. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 30 s. Se realizó un ciclo final a 95°C durante 1 minuto y 65°C

durante 1 minuto, seguido de 40°C durante 30 segundos. El gen β -actina se usó como control constitutivo para normalizar todas las muestras. Los niveles de expresión de ARN se calcularon de acuerdo con Livak y Schmittgen (2001). Los cebadores de PCR utilizados se describen en Barranco et al. (2017).

Resultados y Discusión

Residuos de fitosanitarios

Con excepción del azufre y el cobre, los residuos fitosanitarios en las matrices vegetales estaban todos por debajo de los valores de LMR de la UE (véase el Reglamento (CE) no 396/2005) por lo que nunca presentaron ningún riesgo de toxicidad. Folpet fue detectado en uvas y mostos de Aia (PDO Getaria), pero no en vinos. Iprovalicarb pareció concentrarse en los mostos y vinos de las parcelas de Aia. Dimethomorph y triadimenol se detectaron en todas las matrices de las parcelas de Aia. En general, en las parcelas de Aia se pudo detectar una mayor variedad y concentración de residuos fitosanitarios. Sorprendentemente, se detectaron algunos productos químicos que no se habían aplicado en esa parcela específica o en esa área endémica específica, al menos en nuestro estudio. Metalaxyl, por ejemplo, se detectó en aguas, suelos, uvas, mostos y vinos de Laguardia (DOP Rioja) aunque no se había empleado en esas parcelas. Boscalid parecía persistir en los suelos, ya que se detectó incluso cuando no se había aplicado y se transmitió a mostos, uvas y vinos, especialmente en las parcelas de Aia. Esto podría deberse a la persistencia de algunos productos utilizados en años anteriores o a la deriva de algunos productos de una parcela donde se aplicó a la otra donde no se aplicó. Este hecho enfatiza la importancia de aplicar correctamente y con la maquinaria correctamente revisada todos los productos fitosanitarios, así como estudiar para cada caso específico el tiempo requerido para eliminar los productos fitosanitarios persistentes de una parcela, especialmente antes de establecer un área de cultivo ecológico.

Efectos en embriones de pez cebra

Los resultados detallados de la expresión génica para cada subparcela se muestran en la Figura 1.

Área endémica de mildiu (Aia)

Samples	Not treated			Organic phytochemicals			Conventional fungicides application			Risk emission by weather station		
	1A	7A	12A	3B	5B	9B	2D	6D	10D	4E	8E	11E
Genes	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g
Grapes	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Must	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Wine	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Área endémica de oidio (Laguardia)

Samples	Not treated			Organic phytochemicals			Conventional fungicides application			Grade-day summation and phenology			Risk emission by weather station		
	1A	7A	11A	2B	6B	13B	4D	8D	15D	5E	10E	14E	3C	9C	12C
Genes	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g	c i g
Grapes	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Must	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Wine	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

- Induced
 - Repressed
 - Not affected
 - Not determined
- Genes**
 c = *cyp1a1*
 i = *il1β*
 g = *gstp1*

Figura 1. Resumen de los resultados de expresión génica en embriones de pez cebra expuestos al extracto de uvas, mosto y vinos tratados.

Los datos de expresión génica no permitieron correlacionar una estrategia de aplicación fitosanitaria con un efecto en el pez cebra; sin embargo, permitieron correlacionar el efecto con el tipo de parcela para mosto y vino. Los mostos provenientes de la parcela de Aia indujeron en gran medida el gen *cyp1a1*, mientras que los mostos provenientes de las parcelas de Laguardia no lo hicieron. En cuanto a los vinos, por otro lado, fueron los provenientes de parcelas de Laguardia los que afectaron al gen *cyp1a1* reprimiéndolo, los vinos de esas parcelas también reprimieron el gen *il1β*. En uvas de Laguardia, la expresión génica en pez cebra permitió separar la posición de las sub-parcelas (filas bajas / filas superiores).

Conclusiones

En todas las subparcelas tratadas, los valores de residuos fitosanitarios estaban por debajo del LMR de la UE, por lo tanto, no presentaban problemas de toxicidad. Para evitar derivas de sustancias químicas (como las detectadas para boscalid, dimethomoph y triadimenol) es importante mejorar la aplicación de los productos.

Se desarrolló una metodología para utilizar el modelo animal de pez cebra para evaluar los efectos de los productos fitosanitarios en matrices enológicas. Como las cantidades de residuos fueron extremadamente bajas, no se detectaron diferencias significativas en los efectos sobre el pez cebra; a pesar de esto, los efectos fueron diferentes dependiendo del origen de las muestras y de la posición de la subparcela.

Referencias

Barranco A, Escudero L, Sanz Landaluze J, Rainieri S. (2016) Detection of exposure effects of mixtures of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology* 37(3):253-264.

Dufour M C, Fontaine S, Montarry,J, Corio-Costet M F.(2011) Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science* 67 (1): 60–69.

Lemos J, Sampedro MC, de Ariño A, Ortiz A, Barrio RJ. (2016) Risk assessment of exposure to pesticides through dietary intake of vegetables typical of the Mediterranean diet in the Basque Country, *Journal of Food Composition and Analysis* 49: 35–41.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.

Marie-France Corio-Costet, M F, Dufour MC, Cigna J , Abadie P, Chen W J. (2011) Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur J Plant Pathol* 129:315–329.

Agradecimientos

Investigación financiada por la Comisión Europea (proyecto LIFE FITOVID, código de subvención LIFE13 ENV / ES / 000710). Ministerio de Economía y Competitividad de España (proyecto SAFEFOOD, código de subvención, CTQ2014-54801-C2-2-R)