
AVANCES EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES DE LA VID PROVOCADAS POR VIRUS*

Judit Monis¹, Fiona Constable², Nuredin Habili³

¹Eurofins STA Laboratories, Gilroy, CA

²Department of Primary Industries, Victoria, Australia,

³Waite Diagnostics, Urrbrae, South Australia

*El presente artículo está dedicado al Dr. Rod Bonfiglioli, colega altamente respetado, quien falleció en mayo del 2008.

RESUMEN

Los virus, viroides y fitoplasmas fueron el tema central en el 16° Encuentro del Consejo Internacional para el Estudio de Enfermedades de la vid producidas por virus o microorganismos semejantes a virus (ICVG), realizado en Dijon, Francia, desde el 31 de agosto hasta el 4 de septiembre de 2009. El Encuentro ICVG se organiza cada tres años con el fin de promover la colaboración y la interacción entre los expertos dedicados a la patología de la vid.

Se organizaron dos visitas al campo para conocer de cerca los problemas de las enfermedades locales, la selección de plantación y la prevención de dichas enfermedades. Los delegados visitaron los viñedos en Côtes de Beaune, Hautes Côtes de Nuits, Davayé (Mâconnais) y en la región Jura (Château Chalon) (ver foto: Mâcon Vineyard 3)

Se prepararon 161 presentaciones científicas agrupadas en 9 sesiones principales. Los lectores pueden obtener más información en la siguiente dirección de internet:
<http://www.icvg.ch/archive.htm>

Discurso de apertura

Giovanni Martelli inició el encuentro con una revisión del progreso en la investigación de virus presentes en la vid en los últimos 3 años. Entre los ponentes principales se incluyó al Dr. Paul Gugerli, quien presentó una recopilación histórica de los anticuerpos del *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV-1-9) producidos en los últimos 25 años; y al Dr. Valerian Dolja, quien se refirió a la evolución y a la función del gen Closteroviridae en la vid, familia de virus que incluye al *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaVs).

Material de planta y origen del virus en la etapa de detección

Los científicos de la Universidad de California (UC Davis) y de la Universidad de Estado de Mississippi en forma independiente anunciaron el descubrimiento de un nuevo virus denominado *Grapevine Syrah virus-1* (GSyV-1) y *Grapevine virus Q* (GVQ), respectivamente. Se procedió al aislamiento de cada virus presente en distintas vides y con distintos síntomas, lo cual demostró que el virus GSyV-1 resultó característico de la variedad Syrah y con síntomas de deterioro; mientras que el virus GVQ se encontró sin síntomas de deterioro en el arbusto salvaje *Vitis rotundifolia*. La nomenclatura aceptada para este virus es GSyV-1

El deterioro de la vid Shyras (también conocido como enfermedad del Shyras en California), se identificó por primera vez en los viñedos de California en el 2004. Entre los síntomas se incluyen: uniones de injertos hinchados, agrietamiento y



erosión de la madera, necrosis del tallo, enrojecimiento de la hoja y achicharramiento, deterioro de la vid y su posterior muerte.

Si bien los síntomas propios del deterioro del Shyraz descritos en Francia parecían ser similares, los científicos de Francia y Sudáfrica quienes visitaron los viñedos en California confirmaron que dichos síntomas para esta enfermedad eran diferentes en aquellos países. La etiología de la enfermedad sigue siendo incierta debido a la baja correlación (19%) que existe entre la detección de GSyV-1 y los síntomas de deterioro del Shiraz.

Un estudio llevado a cabo en el laboratorio de la UC Davis detectó GSyV-1 en cigarras recolectadas de vides infectadas con GSyV-1, confirmando la posibilidad de una transmisión a través de este insecto. El descubrimiento de este virus en especies silvestres asintomáticas tiene consecuencias relevantes para el estado sanitario de los rizomas utilizados en la viticultura, dado que estos no demuestran síntomas específicos de virus.

Un estudio, cuyo objeto fue la validación de estrategias de muestreo siguiendo procedimientos ya utilizados en Australia, demostró que los virus podían ser detectados a finales de la primavera y comienzos del otoño, en vides inoculadas por injertos con GLRaV-2, GLRaV-3, y *Grapevine fleck virus* (GFkV). El mismo estudio demostró que el pecíolo verde y el tejido del vástago pueden ser utilizados de un modo confiable para la detección de los virus arriba mencionados.

Fanleaf y otros virus transmitidos por nematodos

Según análisis recientes sobre datos moleculares acerca del *Xifinema index*, el cual transmite el virus *Grapevine fanleaf* (GFLV), se ha propuesto, desde distintas áreas geográficas, un origen común a este nematodo: Medio Oriente. Por el contrario, los nematodos *Xifinema* en Norte América y sus virus asociados tales como el *virus de la hoja rasposa de la cereza*, el *virus del mosaico del durazno*, el *virus de la mancha anular del tomate* y el *virus de la mancha anular del tabaco*, comenzaron a expandirse únicamente por este continente. El alto grado de retención del virus junto a una larga supervivencia de nematodos infecciosos (por lo menos de 7 años), ante la falta de plantas huéspedes, sugiere que las medidas de control deben enfocarse en el desarrollo de vides resistentes a virus y a nematodos.

Según un estudio en Eslovenia, se confirmó que el tejido joven del vástago en crecimiento activo es el mejor material de prueba para GFLV, en contraposición al tejido de la vid inactivo. Esto se debe a que el virus reside en el parénquima y se mueve rápidamente hacia las partes más jóvenes durante la época de cultivo.

Epidemiología y el estudio de los viñedos

Las especies silvestres y nativas *Vitis* demostraron ser un depósito de virus que infecta a viñedos cultivados y puede jugar un rol significativo en la epidemiología de virus. Se han detectado en California, EE.UU. virus asociados a *Rupestris stem pitting* (RSPaV), GLRaV-2, y a *Grapevine B* (GVB), mientras que en Australia, la vid ornamental (*Vitis coignetiae*) se infectó con RSPaV (Habili, datos no publicados). En Irán, el virus *Grapevine A* (GVA) resultó ser el más predominante detectado en vides silvestres y cultivadas, mientras que los virus GFkV, GLRaV-2, y GLRaV-6 fueron encontrados en vides silvestres.

En gran cantidad de países, se detectaron con mayor frecuencia infecciones mixtas de GLRaV-3 con otras especies del tipo GLRaV. Por otro lado, se encontró RSPaV en vides cultivadas y en especies silvestres *Vitis* alrededor del mundo con un mayor grado de incidencia.



Un estudio destacó la importancia de los vectores, los cuales ayudan en la transmisión de virus, y la posible influencia de la variedad y los rizomas en la incidencia y distribución de virus en dos regiones al norte de España, Rioja y Galicia.

El virus GFLV resultó más predominante en la Rioja y su distribución fue el indicio de la presencia del nematodo vector. La tasa de incidencia de GLRaV-3 en Galicia resultó alta como consecuencia de la transmisión del virus por cochinillas vectores; mientras que en La Rioja, donde no hay presencia de cochinillas vectores, no se observó ninguna evidencia de transmisión de virus GLRaV-3 durante 20 años. La presencia de GLRaV-1 fue variable dentro de cada región, pero disminuyó en la región de la Ribeira Sacra, aún con presencia de vectores. Se indicó que la introducción de nuevas variedades o rizomas ha influenciado este cambio en el predominio de la infección de virus.

Las cochinillas ninfas *Heliococcus spp.* al norte de Italia pudieron adquirir tres tipos de virus: GLRaV-1, GLRaV-3, y GVA simultáneamente, pero éstas sólo podían transmitir GLRaV-3 en forma eficiente. Por otro lado, se detectaron cochinillas harinosas de los citrus (*Planococcus citri*) como un vector adicional para GLRaV-1. Anteriormente, se había demostrado que dos especies de insectos de cuerpo blando (*Coccus spp.* sin publicar) transmitían GLRaV-3. Debido a que los insectos de cuerpo blando poseen una débil adaptación a las vides, los científicos opinan que estos no jugarán un importante rol en la propagación de virus.

Fitoplasmas

La sesión incluyó 11 presentaciones orales y 29 afiches, todos centrados en fitoplasmas del tipo flavescentiae dorée y stolbur (bois noir). Por primera vez, se reporta la presencia de fitoplasmas en Sudáfrica. Los lectores pueden obtener más información en la siguiente dirección de internet: <http://www.icvg.ch/archive.htm>

Nuevas tecnologías en la Biología molecular.

Hasta la fecha, se han detectado 60 virus en viñedos. Sin embargo, con la llegada de nuevas tecnologías moleculares pueden descubrirse en la actualidad muchos de los virus desconocidos. Se ha utilizado la tecnología de secuencia de alto rendimiento para identificar las secuencias de nucleótidos relacionadas con virus desconocidos en vides infectadas. Esta tecnología es posible gracias a que se conoce la secuencia de genomas de la vid.

Las secuencias generadas, tanto de vides saludables como infectadas, son analizadas y plasmadas en una base de datos para determinar la presencia de potenciales patógenos. Mediante el uso de esta tecnología, los investigadores de la UC Davis intentaron determinar el agente causal del deterioro del Syrah, una enfermedad de etiología desconocida de gran importancia desde un punto de vista económico. La tecnología de secuencia de alto rendimiento resulta muy eficaz, sin embargo, debido a que la misma genera costos altos sólo se analizaron dos vides (una sana y otra infectada) en este estudio.

La estrategia de detección por micromatrices para un análisis múltiple y paralelo de 44 virus desarrollado en Chile, promete ser rápido y confiable, permitiendo la detección de una gran cantidad de virus. La UC Davis ha estado utilizando con éxito métodos PCR de baja densidad (LPDA) basados en tecnología TaqMan para la detección de virus en la vid, la cual resulta sumamente sensible y capaz de detectar mayor cantidad de virus en las mismas muestras en comparación al protocolo de RT-PCR.



Control y efectos del virus en la producción de uva y posterior calidad del vino

Se llevó a cabo una prueba en viñedos con 3 años de edad en la región de Champagne en Francia, para determinar el efecto de la resistencia del virus en los rizomas, manifestando la cubierta proteínica de GFLV. Si bien el rizoma modificado genéticamente no ofreció resistencia a la infección GFLV, se observó una demora en la manifestación del síntoma en vides transgénicas, comparadas con aquellas de control.

En los últimos años, la propagación de GLRaV-3 en Sudáfrica, California, y Nueva Zelanda se incrementó considerablemente, demostrando también un crecimiento vertiginoso en algunas regiones. Este suceso se asemeja a la epidemia de la Filoxera en Europa durante los años 60.

Un estudio iniciado en el 2002, tuvo como objetivo evaluar los métodos de control de la propagación de GLRaV-3 en los viñedos en Sudáfrica. El experimento incluyó vides sanas, plantadas en tierras donde nunca existieron viñedos anteriores, rodeadas a su vez de viñedos infectados con GLRaV-3. Se puede decir que varias prácticas, incluyendo la remoción de vides infectadas, el tratamiento con insecticidas y un control sanitario de agricultores y herramientas, llevó a una reducción drástica en la incidencia y propagación de la enfermedad. Se espera que la incidencia del leafroll (enrollamiento) disminuya una vez realizada la remoción de vides viejas e infectadas que crecen en la parcela experimental en el sentido opuesto al viento.

El éxito del proyecto se debió a la coordinación entre agricultores, a la excesiva confianza en el uso de insecticidas, a los ensayos utilizados para la detección de virus y el estar en constante alerta para detectar posibles vides infectadas. Aunque el enfoque no parece ser sustentable, los agricultores de Sudáfrica esperan poder implementar una estrategia de manejo integrado contra la plaga, hasta tanto la enfermedad sea controlable. Mientras que en Sudáfrica los tratamientos de insecticidas para cochinillas vectores han resultado en una estrategia de control efectiva, en Nueva Zelanda no fue el caso, dado que se eliminaron insectos beneficiosos para la vid.

A través de un estudio llevado a cabo al norte de España y el cual utilizó la microvinificación para fruta recolectada de vides con GLRaV-3, vides infectadas con GFLV y aquellas no infectadas, se demostró que la presencia de posibles virus refleja un efecto drástico tanto en la fruta como en la calidad del vino. La infección GFLV tuvo como consecuencia una reducción en el alcohol, en el ácido tartárico y en los antocianos, mientras que el GLRaV-3 resultó en una disminución del contenido de alcohol y de la intensidad de color.

Otro estudio indicó que el desarrollo de la vid (es decir, el vigor de la planta, la calidad y cantidad del racimo de uva) mejoró luego de la eliminación de GLRaV-1 y GLRaV-3, respectivamente. Los autores concluyen que la variación en la calidad del vino depende del clon, del virus, del medio ambiente y de prácticas de viticultura. Se necesitan más estudios para comprender la interacción dada entre el virus, la vid y la calidad del vino.

Los investigadores de California estudiaron el efecto de GLRaVs, GVB, GFkV, y RSPaV en el crecimiento de la vid y en la calidad de la fruta en infecciones simples y mixtas. Los resultados demostraron una reducción drástica de azúcar en Cabernet Sauvignon infectado con GLRaV, sin importar el rizoma utilizado. No hubo diferencia en el contenido de azúcar de la fruta entre vides sanas e infectadas con RSPaV.



Los síntomas foliares variaron notablemente al injertar uno de los tratamientos de infección múltiple en rizomas diferentes. Los autores adoptaron como hipótesis una tolerancia variable en diferentes virus, e indicaron que la infección GVB posee efectos severos en determinados rizomas, en particular en el Freedom.

Virus del complejo leafroll

De momento, se está llevando a cabo una revisión de la clasificación taxonómica dentro de la familia Closteroviridae. En la actualidad, existen dos géneros dentro de la familia Closteroviridae, *Closterovirus* y *Ampelovirus* respectivamente, que incluyen virus de enrollamiento conocidos. Por lo tanto, se presentará una propuesta al Comité Internacional de Taxonomía de Virus con el objeto de modificar el estado del GLRaV-4, -5, -6, y -9, desde especies de virus hasta cepas de un solo virus. Dicha propuesta se basa en las similitudes moleculares y serológicas de estos virus.

Uno de los virus GLRaV-8, reportado antes de la caracterización del genoma de la vid, será eliminado debido a que su existencia se basó en secuencias parciales y en serología que compartían un alto grado de homología con el genoma *Vitis*. Otra propuesta es dividir el género *Ampelovirus* en dos subgrupos: A y B. El subgrupo A, incluiría especies con partículas grandes y una organización genética más compleja (tales como GLRaV-1 y GLRaV-3), usualmente asociado a síntomas más severos (ver Figura-M: Malbec CW14 LR3), mientras que los miembros del subgrupo B estarían compuestos por virus con estructuras genéticas sencillas tales como GLRaV-4, -5, -6, y -9 (ver Figura-S: GLRaV-9 en el clon Shiraz BVRC12 en el Waite Vineyard, Australia).

La disposición del GLRaV-7, el cual se encuentra relacionado vagamente al virus del enrollamiento, dependerá del resultado de los estudios en relación a la transmisión de vectores.

Las cepas del mismo virus dentro del subgrupo pueden variar considerablemente. Por ejemplo, los GLRaV-3 aislados de Sudáfrica difieren de aquellos provenientes de los de EE.UU. y Chile. Por otro lado, un aislado de GLRaV-3, detectado únicamente por ELISA en uvas Crimson (sin semillas) en Australia, parece contener caracteres fenotípicos aceptados, mientras que un aislado severo en la misma variedad causa graves síntomas y resulta en caracteres de la baya no deseados.

El virus GLRaV-2 es el único miembro conocido del género *Closterovirus* que infecta las vides. El virus consiste en un número de cepas diferentes asociadas a la incompatibilidad de injertos. Un estudio llevado a cabo en Argentina demostró que el análisis RFLP resultó útil para evaluar la variabilidad genética de aislados de campo en este tipo de virus. En países donde el injerto de rizomas es obligatorio para controlar la Filoxera, la infección del GLRaV-2 se ha convertido en todo un desafío.

Los programas de selección sanitaria deben apuntar a evaluar y suprimir este virus de los bloques certificados. En una prueba de injerto en Cabernet Sauvignon infectado con GLRV-2 y -3 e injertados a un número de rizomas, surge a la vista que Paulsen 1103 y Rupestris St George demostraron ser los más tolerantes, mientras que Kober 5BB fue el rizoma más sensible.

Complejo de madera rugosa

Los *viti virus*, incluyendo GVA, GVB, *Grapevine virus D* (GVD), y *Grapevine virus E* (GVE) se encuentran asociados al complejo de madera rugosa. Los estudios reportaron que el GVA se transmite por cochinillas en conjunto con *Ampelovirus* GLRaV-1 y/o GLRaV-3, en tanto que *Grapevine virus A* se lo asoció con la



enfermedad del Shiraz (descrita en Shiraz, Merlot, y Gamay) en Sudáfrica y Australia.

Los síntomas de la enfermedad del Shiraz (no debe confundirse con el deterioro del Shiraz) incluyen: desborre retrasado de la yema, racimos de uva pequeños con color deficiente en las bayas, bastones gomosos (leñificación escasa) y muerte prematura.

En Sudáfrica, GVA y GLRaV-3 suelen aparecer juntas. Los investigadores sospechan que el GLRaV-3 puede necesitarse para la propagación natural de GVA en Sudáfrica. Sin embargo, en Australia, no se ha detectado GLRaV-3 en vides con la enfermedad del Shiraz.

Las cepas de RSPaV fueron asociadas con dos principales enfermedades de vid. Por un lado, se observó una asociación del 93% entre RSPaV-1 y la necrosis del nervio de la vid, mientras que el 92% de las vides con el virus asociado al listado o viruela del tallo de Rupestres fueron infectadas con RSPaV-3. Tanto RSPaV como GVA se detectaron en las semillas de tres variedades de vid ya examinadas.

Enfermedades nuevas y aquellas de origen desconocido

Estudios en Irán confirmaron que la asociación de *Grapevine yellow speckle viroid 1* y/o *2* con GFLV llevaron a síntomas causados por efecto de banda.

Algunos estudios en Francia no han podido atribuir los síntomas de deterioro del Syrah a ningún patógeno, es decir, a ningún virus o viroide conocido. El deterioro del Syrah podría ser potencialmente causado por la combinación de varios patógenos, factores de stress y por composición genética de tal variedad.

Por otra parte, la asociación de virus a la enfermedad del Shiraz en Sudáfrica permanece incierta. Continúan los estudios en la región para determinar qué variantes de GVA se asocian con dicha enfermedad. Del mismo modo, no pudieron detectarse fitoplasmas en el material afectado por esta enfermedad en Sudáfrica. Se espera que más especies de virus presentes en la vid sean definidas a futuro, y éstas podrán ser discutidas muy probablemente en futuras reuniones de ICVG.

Agradecimientos

La presencia de Nuredin Habili en la conferencia del ICVG fue apoyada en parte por: Barossa Grapegrowers Vine Selection Society, Adelaide Hills Vine Improvement Society, y Australian Vine Improvement Association. Fiona Constable agradece al Grape and Wine Research and Development Corporation por su apoyo financiero y al Department of Primary Industries en Victoria por su presencia en la conferencia del ICVG.



Notas fotográficas



Mâcon Vineyard 3

Vista panorámica de los viñedos típicos de Burgundy. Ver el "court noue" de aspecto irregular y amarillento causado por la infección del virus *Arabis mosaic* y el *Grapevine fanleaf*. (Foto: cortesía de Judit Monis)



GLRaV-9 Shiraz Waite

Figura-S: Primer plano de síntomas moderados causados por *Grapevine leafroll associated virus -9* en Shiraz. (Foto: cortesía de Nuredin Habili)



Malbec CW14 LR3

Figura-M: Primer plano de síntomas severos causados por *Grapevine leafroll associated virus -3* en Malbec. (Foto: cortesía de Nuredin Habil)

Recibido: Diciembre 2009

Aceptado: Enero 2010

NDLR: Si desea contactarse con alguno de sus autores comuníquese a enologia@revistaenologia.com