

Los virus de la vid. Herramientas para su detección

Al no haber medios de lucha, la única vía para combatir las virosis de la vid es la detección precoz a través de análisis de suelo y de material vegetal, servicios que ofrece el Laboratorio Regional

Texto: *Milagros Marín Terrazas*. Departamento de Biología Vegetal del Laboratorio Regional

Placas ELISA donde la coloración amarilla indica la detección del virus analizado. / Ch. Díez

Las virosis que afectan al viñedo, fundamentalmente entrenudo corto y enrollado, pueden causar graves daños en las producciones y acortar la vida de las cepas. Son enfermedades sin tratamientos ni preventivos ni curativos, por lo que la detección precoz a través de análisis de suelos (para saber si hay presencia de vectores transmisores) y de material vegetal (para ver su estado sanitario) son herramientas fundamentales para el viticultor, sobre todo al realizar una nueva plantación. El Laboratorio Regional de La Grajera ofrece estos servicios de análisis por diferentes técnicas acreditadas. En este artículo, además de una descripción de las virosis y sus síntomas, se dan algunas claves de cómo recoger muestras de suelo o de planta, el momento más indicado para hacerlo y las técnicas analíticas utilizadas para su detección.

Los virus son un grupo de patógenos que están formados por material genético rodeado por una cubierta proteica. Por sí solos no pueden sobrevivir; necesitan parasitar una célula para poder multiplicarse, pudiendo provocar enfermedades en los vegetales que ocasionan grandes pérdidas. Se conocen más de 700 especies virales que afectan a plantas.

Existen diferentes formas de transmisión de los virus; la más importante es la vegetativa (injerto). También pueden transmitirse mecánicamente (poda, rozamiento...), por semilla o polen y por vectores. Una vez que el virus ha penetrado

en la planta, se mueve dentro de ella de forma sistémica, colonizándola. Los síntomas que producen en las plantas pueden ser muy variados: decoloraciones, mosaicos, amarillos, enanismos, deformación de tejidos, necrosis... y suelen dar nombre a las enfermedades que producen; por ejemplo: enrollado de la vid.

No existe ningún método curativo para las enfermedades producidas por virus, por lo que hay que tomar medidas preventivas basadas en evitar la entrada y transmisión de estos patógenos; de ahí que sea interesante detectar su presencia en las plantas antes de que se muestren los

síntomas. Esto es posible en la actualidad gracias al desarrollo de técnicas analíticas serológicas y moleculares que permiten, con un análisis del material vegetal en el laboratorio, detectar la presencia del virus en la planta cuando tiene un nivel de infección muy bajo y aún no son visibles los síntomas. En ocasiones, los síntomas que presentan las plantas pueden ser debidos a otros patógenos distintos a virus, por lo que el diagnóstico visual no es suficiente y son precisas estas técnicas para realizar un correcto diagnóstico de la enfermedad.

Principales virus de la vid

Se han detectado más de 60 virus que afectan al viñedo y cuya presencia se manifiesta, en mayor o menor medida, por una pérdida de vigor en las plantas, una maduración irregular y, en definitiva, un menor rendimiento.

Algunos de los virus detectados, considerados "graves", pueden ser responsables de pérdidas de producción de hasta el 90%, como en el caso de infecciones severas de *Grapevine fanleaf virus* (entrenudo corto), o del 40% si nos referimos a *Grapevine leafroll virus* (enrollado). Pero



En las vides afectadas de entrenudo corto se observan bifurcaciones, dobles nudos y fasciaciones en el sarmiento. / José Luis Ramos



Síntomas de entrenudo corto en pámpanos, donde se aprecia amarilleamientos y dentición muy acusada. / José Luis Ramos

no todos los virus detectados se traducen en enfermedades a considerar en los viñedos; solo unos pocos causan pérdidas económicas significativas.

Teniendo en cuenta que ante una infección viral no existen medios de lucha y que la principal vía de transmisión es la vegetativa, el viticultor debe tener especial precaución en comprobar el estado sanitario del material vegetal que va a plantar para prevenir las enfermedades de origen vírico en los viñedos.

Dentro de las enfermedades causadas por virus, las de mayor importancia son:

- Degeneración infecciosa (causada por GFLV en la mayor parte de los casos, y otros virus del mismo grupo, Nepovirus, como ArMV).

- Enrollado (el virus GLRaV es el responsable de esta enfermedad, existen varios serotipos de este virus; GLRaV 3 es el más importante por el daño que produce).

- Jaspeado (GFKV).

- Madera rugosa (son varios los virus asociados a esta enfermedad).

Este artículo se ocupa a describir únicamente los virus que están regulados por el Reglamento Técnico de Control y Certificación de plantas de vid 208/2003

del 21 de febrero, modificado por la Orden APA/274/2006, que determina que las plantas certificadas han de estar libres de los virus que se describen a continuación.

Entrenudo corto

Grapevine fanleaf virus (GFLV) o entrenudo corto es el virus de mayor incidencia en los viñedos riojanos. Si se encuentran infectados por él tendrán una menor productividad, un menor vigor y una menor longevidad. Se manifiesta con los siguientes síntomas:

- En sarmientos podremos observar entrenudos muy cortos entre otros de tamaño normal, fasciaciones (aplastamientos) en las que se apreciará en muchas ocasiones una doble médula, bifurcaciones en la parte terminal y varias yemas sobre un mismo nudo.

- En hojas, amarilleamientos, dentición más acusada y seno peciolar muy abierto.

- En los racimos, la presencia del virus se traduce en un cuajado defectuoso (corrimiento) y alteraciones en la maduración.

Además de transmitirse de forma vegetativa, es importante su propagación

por nematodos del género *Xiphinema*, concretamente *Xiphinema index* que actúan como vector del virus, pasándolo de las raíces de una planta a las de otra, por lo que el viticultor habrá de controlar la presencia de este vector en el suelo.

La detección de GFLV en laboratorio es eficaz a partir de material vegetal de cualquier parte de la planta y durante todo el ciclo vegetativo.

Virus del enrollado

Grapevine leafroll virus (GLRaV) o enrollado es, después del virus del entrenudo corto, el que causa más pérdidas de producción en La Rioja. Se pueden diferenciar hasta 11 serotipos, pero los que tienen mayor incidencia son el 3, seguido del 2 y del 1. Las plantas certificadas han de estar libres de GLRaV1 y GLRaV3.

- Los síntomas son visibles en las hojas, que se enrollan hacia el envés al final del ciclo vegetativo (especialmente en el caso de GLRaV1) y adquieren coloraciones rojizas en variedades tintas y amarillas en blancas, que no afectan a los nervios (más acusado en GLRaV3).

- La maduración de los racimos no es homogénea. El número y tamaño de

los racimos disminuye. Las bayas tienen menos contenido en azúcar y antocianos y mayor grado de acidez.

Además de por vía vegetativa, los dos virus graves del enrollado (GLRaV 1 y 3) son transmitidos por cochinillas algodonosas de las familias *Pseudococcidae* y *Coccidae*.

Las técnicas de detección son más sensibles sobre hojas adultas y sobre madera agostada y la época recomendada para su detección es final de verano y otoño, aunque también es efectiva una analítica sobre madera agostada en invierno. El virus puede no detectarse sobre hojas jóvenes en primavera y principios de verano.

Mosaico del Arabis

Arabis Mosaic virus (ArMV) tiene otros huéspedes además de la vid. Los síntomas que manifiesta son similares a los producidos por entrenudo corto, pero menos severos. En nuestro país está presente en la vid pero de forma muy puntual.

Como en el caso del entrenudo corto, además de transmitirse por el material vegetal, puede hacerlo por nematodos del género *Xiphinema*, en este caso *X. diversicaudatum*.

También se puede detectar en cualquier época del año y a partir de cualquier parte de la planta.

Virus del jaspeado

Grapevine fleck virus (GFKV) o virus del jaspeado es muy común pero latente en la mayoría de las variedades. No existe una sintomatología específica excepto para *Vitis rupestris*.

Su presencia influye en el enraizamiento y también afecta a la afinidad patrón-variedad en plantas injertadas.

En vides sobre las que se ha detectado podemos ver manchas cloróticas en primavera que se desvanecen en verano. Por ello, en primavera; sobre hoja extendida, es buen momento para su detección en laboratorio, pero también se obtienen buenos resultados sobre madera agostada.



Enrollamiento hacia el envés de la hoja en una cepa de variedad blanca afectada por GLRaV, donde se ve la decoloración amarillenta que no afecta a los nervios. / José Luis Pérez Marín



Síntomas observados en cepas en las que se ha detectado la presencia de virus de mosaico de Arabis. / Milagros Marín

Métodos de lucha

No existen tratamientos químicos ni preventivos ni curativos para combatir las enfermedades producidas por virus en vid.

Las únicas medidas que puede tomar el viticultor dependen de las técnicas culturales y se fundamentan en la prevención:

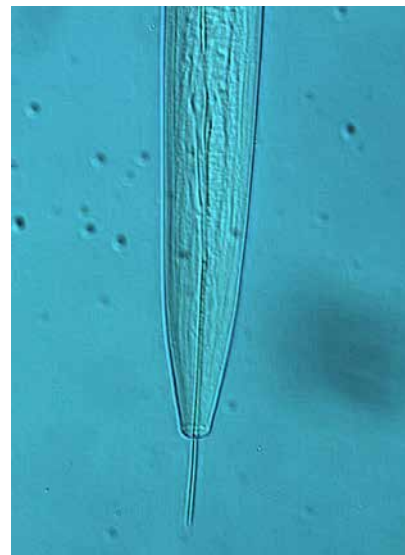
- eliminación de material vegetal infectado,
- control y erradicación de los vectores transmisores de virus (nematodos, cochinillas...), y
- utilización de material libre de virus al realizar la plantación.

Análisis en laboratorio

Para un adecuado manejo de las enfermedades es necesario conocer su etiología; es decir, saber el agente causal responsable de la patología. Por esto, tanto en el caso del diagnóstico y aún más en la detección, es imprescindible un análisis en el laboratorio.

El Laboratorio Regional, ubicado en la finca La Grajera, presta un servicio de análisis a organismos públicos y privados en los ámbitos agroalimentario, sanitario y ambiental. Si se visita su página web (www.larioja.org/laboratorio), encontraremos información sobre las distintas determinaciones que se ofertan, precio, tiempo de respuesta y recomendaciones para la toma de muestras, ya que la efectividad de una analítica depende de que esta se haga correctamente.

El laboratorio está estructurado en dos grandes áreas de trabajo, un área química y



Parte posterior de una hembra de *Xiphinema index*; a la derecha, parte anterior con el estilete fuera. / Milagros Marín

otra biológica, que a su vez contienen distintas líneas. Dentro del área biológica, la línea de Biología Vegetal tiene como objetivo la detección (para adoptar medidas preventivas) y el diagnóstico e identificación (para un adecuado manejo de enfermedades) de organismos nocivos de los vegetales.

Son numerosas las determinaciones que se realizan, tanto respecto a patógenos como a matrices y a técnicas analíticas. Describiremos a continuación las relacionadas con los virus en vid, que son de gran utilidad para viticultores y viveristas.

Detección de nematodos vectores en suelo

Los nematodos del género *Xiphinema* transmisores de virus, *X. index* y *X. diversicaudatum*, viven en el suelo, por lo que esta determinación se realiza sobre muestras de suelo de parcelas destinadas a nuevas plantaciones de vid y también en parcelas en las que se observan síntomas de virus de entrenudo corto y mosaico de

Arabis, o se ha detectado la presencia dichos virus y se quiere comprobar si está presente el vector.

Los nematodos son gusanos microscópicos con forma de hilo. Los que son parásitos de plantas poseen un estilete que les permite perforar las células vegetales para alimentarse de ellas o actuar como vectores de enfermedades. En los cultivos, los síntomas de las enfermedades originadas por estos parásitos se manifiestan en rodales.

La única forma eficaz de erradicar estos parásitos es el arranque de vides infectadas y la posterior eliminación de las raíces que puedan ser reservorio del nematodo.

Estos nematodos son capaces de vivir en el suelo varios años después de arrancar una plantación, por lo que la medida más efectiva sería dejar el terreno sin plantar vid durante al menos 5 años. Esta práctica, en ocasiones, no es bienvenida por los viticultores y se opta por la aplicación de tratamientos químicos para

la desinfección del suelo, en el caso de que se detecte la presencia del vector, aun sabiendo que estos tratamientos no son totalmente efectivos y que, además, es necesaria una autorización excepcional del Ministerio de Agricultura para su aplicación, ya que el producto químico utilizado para estos tratamientos tiene su uso prohibido dentro de la Unión Europea. El agricultor tiene que acreditar la presencia en el suelo de nematodos transmisores de virus en vid para obtener la autorización para la aplicación del tratamiento químico, por lo que resulta imprescindible un análisis de suelo que lo determine.

Las muestras serán tomadas tras hacer varias catas en el terreno (9-12 por hectárea), recogiendo tierra a lo largo de la pared de cada cata realizada, eliminando los 5 cm superiores para minimizar la influencia de la sequía, las malas hierbas y los cultivos de cobertura, hasta un mínimo de 30 cm de profundidad. Es aconsejable llegar a los 60 cm, ya que las raíces del viñedo pueden colonizar incluso mayores profundidades. La cantidad mínima de muestra será de 1 kg.

Las poblaciones de nematodos fitopatógenos fluctúan a lo largo del año, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura. Atendiendo a esto, lo normal es encontrar una mayor población de nematodos en otoño y los niveles más bajos serán en verano. No deben tomarse muestras de suelo cuando se encuentre inundado, seco o congelado.

La muestra ha de conservarse hasta su análisis en un lugar fresco. A su llegada al laboratorio se procesará para la extracción de los nematodos y la identificación de los mismos se realizará por técnicas morfológicas.



Observación al binocular de una muestra de tierra procesada para la detección de nematodos transmisores de virosis. / Ch. Díez

Dado que la incidencia del virus del entrenudo corto es frecuente en los viñedos riojanos, también lo es la presencia de su vector, *Xiphinema index*.

Respecto a *Xiphinema diversicaudatum*, hasta el momento no se ha detectado su presencia en viñedos de La Rioja, lo que se corresponde con la incidencia prácticamente nula de ArMV.

Detección de virus en material vegetal

Esta determinación se puede realizar sobre material vegetal con o sin síntomas. En cualquier caso, la muestra debe consistir en una porción de material vegetal: 15-20 cm de sarmiento o 50 g de otro tipo de material (raíces); en el caso de hojas, de 4 a 6 tomadas de distintas orientaciones de la planta. Se recomienda conservarla en refrigeración hasta su envío al laboratorio, que no debe demorarse más de 2-3 días en el caso de material leñoso y 24 horas en el caso de hojas. Para aclarar cualquier duda al respecto se aconseja ponerse en contacto con los técnicos de la línea de Biología Vegetal del Laboratorio Regional.

Técnicas analíticas

El Laboratorio Regional de La Grajera pone a disposición de sus clientes dos técnicas, basadas en principios biológicos distintos, para la detección de virosis en vid:

- **Técnicas inmunológicas**, basadas en las propiedades de la cubierta proteica de los virus.

La técnica inmunológica utilizada en el Laboratorio Regional para la identificación de virus de vid es el método ELISA, a partir de un extracto de la muestra vegetal a analizar. Es la técnica más utilizada para la detección de virus, con un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad, está estandarizada y permite testar numerosas muestras en un periodo de tiempo relativamente corto.

Los ensayos para la detección de los cinco virus exigidos en la certificación de plantas de vivero realizados en el Laboratorio están acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), bajo la Norma ISO/IEC17025 (expediente nº 168/LE399). De hecho, en la actualidad, el Laboratorio Regional

Toma de muestras en suelo

Objetivo	Detección de nematodos del género <i>Xiphinema</i> transmisores de virus en vid
Cómo tomar la muestra	De 9-12 catas/ha Desechar los primeros 5 cm Profundidad mínima 30 cm. Puede llegar a los 60 cm Cantidad: 1 k gr/muestra
Cuándo	Preferiblemente, en otoño El suelo no debe estar inundado, seco o congelado
Técnica analítica	Técnicas morfológicas

Toma de muestras en planta

Objetivo	Detección de virus
Cómo tomar la muestra	Una de estas porciones de la planta: - 15-20 cm de sarmiento - 50 gr de raíz - 4-6 hojas de distintas orientaciones
Cuándo	Entrenudo corto, mosaico de arabis y jaspeado: - durante todo el ciclo vegetativo Enrollado: - finales del verano y otoño, hojas adultas y madera agostada - invierno: madera agostada
Técnica analítica	Técnicas inmunológicas: método ELISA Técnicas moleculares: PCR



Preparación de muestras de sarmientos para su posterior análisis./ Ch. Díez

es el único del ámbito nacional que tiene estas determinaciones acreditadas.

- **Técnicas moleculares**, basadas en las propiedades de los ácidos nucleicos de los virus.

Las técnicas moleculares aportan gran especificidad y gran sensibilidad, por lo que permiten detectar la presencia del patógeno cuando el nivel de infección es muy bajo y no puede ser percibido por técnicas inmunológicas. A este grupo de técnicas pertenece la comúnmente llamada PCR.

El Laboratorio Regional tiene implantadas distintas variantes de la PCR. Se realiza la determinación de virus de vid aplicando RT-PCR a tiempo real. Concretamente, esta técnica se aplica a la detección de los virus GFLV y GLRaV-3, que son los considerados virus graves.

Las técnicas moleculares tienen un coste más elevado, pero son una herramienta muy útil, sobre todo a la hora de comprobar el estado sanitario del material vegetal cuyo destino va a ser la producción de plantas madres.