

DETERMINACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE LA VID CAUSADAS POR VIRUS

Judit Monis, Ph. D

Directora del Servicio de Sanidad Vegetal de los Laboratorios STA, Inc. en Gilroy, California-EEUU.

La sanidad del viñedo es un asunto de capital importancia para garantizar la longevidad y la buena producción del mismo. En el espectro de los agentes causales de enfermedades que afectan a la vid están presentes hongos, virus y bacterias. El accionar de estos puede provocar desde un perjuicio temporal, como es el caso de los hongos como el oidio o la peronospora, que afectan la producción en curso y pueden ser controlados de manera relativamente fácil, o un daño permanente como el que causan virus y bacterias al comprometer seriamente la vida y la producción del viñedo una vez que estos han producido su infección, ya que el único remedio es el arranque y reposición de las plantas afectadas. El presente artículo tratará las enfermedades de la vid, identificando sus agentes causales y los síntomas que generan.

El diagnóstico visual a campo de las enfermedades de la vid es importante, pero últimamente el viticultor debe apoyarse en pruebas de laboratorio para descartar infecciones o determinar el agente causal de la enfermedad.

Palabras claves: enfermedades de la vid, patógenos, síntomas, virus, enrollamiento de la hoja, moteado, complejo de madera rugosa, madera corchosa, ELISA, PCR

Key words: grapevine disease, pathogens, symptoms, virus, leafroll, fleck, rugose wood complex, corky bark, ELISA, PCR

Los viticultores deberían estar en guardia debido a los agentes causantes de enfermedades o patógenos que puedan afectar la calidad del material plantado. Los viñedos implantados pueden albergar distintos tipos de patógenos: fúngicos, bacteriales y virales.

En este artículo, se repasan enfermedades importantes de la vid causadas por virus que son mejor detectadas en otoño mediante métodos de laboratorio. Se describen los métodos de laboratorio más comunes para la detección de virus o el diagnóstico. El lector será informado de algunas características (o síntomas) para la búsqueda y formas de prevenir la propagación de virus perjudiciales en el viñedo.

El establecimiento de un viñedo sano y productivo requiere una inversión considerable de tiempo y recursos. Este artículo ayudará a los viticultores, a los gerentes vitícolas y al personal de viveros a entender las consecuencias de la infección de virus en el tronco de la vid. El diagnóstico visual a campo de las enfermedades de la vid es importante, pero últimamente el viticultor debería apoyarse en pruebas de laboratorio para descartar infección o determinar el agente causal de la enfermedad.

METODOLOGÍAS

Los virus vegetales que infectan a la vid están compuestos por un ácido nucleico (ARN) y una envoltura protectora de proteína (cobertura exterior del virus). Los métodos descritos son diseñados tanto para "ligarse a" o "copiar" una pequeña

porción del virus. Por lo tanto, hay métodos específicos para el virus que deseamos detectar. La detección/diagnósticos se hace por molienda y análisis de muestras de plantas. Dos metodologías principales, ELISA y PCR, son usadas rutinariamente en el laboratorio para la detección de virus de la vid. La indexación biológica (usados por programas de certificación), un método que se apoya en la capacidad de las plantas sensibles y saludables de mostrar los síntomas de enfermedad tras ser injertadas sobre vides infectadas con virus, no serán descriptos en este artículo.

ELISA

Uno de los métodos de diagnóstico más comunes y de precio razonable es ELISA. La prueba (Análisis de inmunoabsorbencia ligado a enzimas) involucra la unión de la cubierta externa del virus con un anticuerpo específico. Un anticuerpo es un tipo especial de proteína elaborada por el sistema inmunológico de un animal en respuesta a una invasión extraña. Los anticuerpos tienen sitios específicos de unión que "reconocen" una forma molecular. Debido a la capacidad de la molécula del anticuerpo para reconocer con precisión y unirse a determinadas formas en otras moléculas, la actividad de acoplamiento del anticuerpo es usada para identificar específicamente virus y otros patógenos vegetales.

La unión del virus al anticuerpo es única, semejante a un puzzle, ajustándose una única pieza en cada lugar por lo que no hay duda sobre la exactitud de los resultados. Con el método ELISA, los extractos del tejido vegetal pulverizado se colocan en un plato de prueba que ha sido recubierto con anticuerpos específicos. Si el virus está presente en la muestra, este se unirá a los anticuerpos específicos sobre el plato y serán detectados por una reacción enzima-sustrato que produce un color de reacción. Las ventajas de ELISA son que pueden testearse muchas muestras al mismo tiempo, que es relativamente de costo reducido y es rápido (los resultados pueden obtenerse en aproximadamente tres días). Sin embargo, sólo debería usarse como un método filtro porque puede no detectar infecciones si el virus se encuentra en bajas concentraciones. Este es comúnmente el caso de los

virus causantes de las enfermedades de leafroll (enrollamiento de la hoja), incompatibilidad de injerto y madera rugosa. Para asegurar la ausencia de infección, un resultado negativo con ELISA debería ser siempre confirmado usando PCR.



Foto 1. El leafroll o enrollamiento de la hoja se encuentra donde sea que se cultiven vides. Los síntomas incluyen el enrollamiento de la hoja hacia abajo y el enrojecimiento o amarilleo de las áreas internervales de las hojas, dependiendo del color de la fruta o de la variedad de uva.

PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación (es decir, producir copias múltiples) de ARN viral, que puede estar presente en la vid en bajas cantidades. Todos los virus conocidos que infectan la vid están conformados por ARN. Anteriormente a la PCR, el ARN debe ser convertido en ADN. Esta técnica es denominada RT-PCR (PCR transcriptasa inversa) y requiere una porción de ARN viral e iniciadores para lograr el inicio del proceso de copiado.

Los iniciadores o primers son cortos segmentos de ADN que activan el proceso de copiado genético. La ayuda de la polimerasa (una molécula que facilita el proceso de copiado del ADN) produce duplicados del ARN viral inicial. La duplicación es repetida varias veces con cada copia haciendo más copias, así luego de 40 ciclos, se han producido más de un billón de copias. Ahora, con el número exponencialmente alto de piezas claves de ARN, el virus puede ser detectado.

En los años recientes hemos incrementado nuestra comprensión sobre la composición del genoma de los virus de la vid, haciendo de PCR un método de preferencia para la detección sensible y específica de estos virus. La PCR es laboriosa y cara, y debería ser usada para la detección de virus encontrados en baja concentración y para la confirmación de ausencia de infección.

ENFERMEDADES VIRALES DE LA VID

La mayoría de los virus que infectan las vides son enfermedades transmisibles por injerto, esto es, son transmitidas de vid a vid por el procedimiento de injertación. Los insectos y

nemátodos también transmiten ciertos virus que infectan a la vid. Por lo tanto, el control de la sanidad y de las plagas sobre todo es importante para mantener un viñedo saludable.

Comúnmente, las enfermedades virales son denominadas en base a la descripción de los síntomas observados en las plantas enfermas (por ejemplo, enrollamiento de la hoja (leafroll), corteza corchosa, fanleaf (hoja digitada), listado de tallos o viruela). Estudios han mostrado que las vides pueden presentar infecciones mixtas, y muchas veces los mismos síntomas pueden ser causados por más de un virus. Además los síntomas pueden estar influenciados por condiciones estacionales y climáticas.

Muchas prácticas realizadas en el viñedo favorecen la transmisión y perpetuación de diferentes virus. Por ejemplo, los viticultores usan el "top working" (operación en la parte superior) como un método para cambiar rápidamente la variedad de uva en el viñedo. Por injertación de un vástago varietal sobre un portainjerto establecido en campo, el viticultor puede estar introduciendo potencialmente uno o más virus cada vez que una nueva variedad es injertada.

Es importante para comenzar un viñedo libre de enfermedades, plantas testeadas. Cualquier trabajo de cambio de variedad posterior, sólo debe ser realizado con variedades analizadas de enfermedades. Por planeamiento de antemano, el productor ahorrará tiempo y dinero (replantar un viñedo enfermo es muy caro). Debido a la transmisión potencial de virus por insectos fitófagos o nematodo, es importante evaluar periódicamente cualquier material vegetal que vaya a ser usado para propósitos de propagación o injertación.

Es importante prestar atención al aspecto de la vid de las plantas madre y depender de análisis de laboratorio cuando se propaguen o injerten plantas desde un viñedo ya establecido

LEAF ROLL- ENROLLAMIENTO DE LA HOJA

Esta enfermedad se encuentra donde sea que se cultiven vides. Las plantas infectadas con la enfermedad de enrollamiento de la hoja son ligeramente más chicas que las sanas. Los síntomas incluyen el enrollamiento hacia abajo y el enrojecimiento o amarilleo de las áreas internervales de las hojas, dependiendo del color de la fruta o de la variedad de uva. Algunas veces la nervadura principal de la hoja permanece verde. Los racimos de uva son más chicos de lo normal y tienen un menor contenido de azúcar.

Varios virus diferentes, llamados virus asociados al leafroll - enrollamiento de la hoja- (GLRaV-1 hasta -9) han sido reportados por estar asociados con la enfermedad del enrollamiento de la hoja. Estos virus se acomodan dentro de dos grupos de virus estrechamente relacionados: Closterovirus (del griego "clostero", parecido a un hilo) y Ampelovirus (del griego "Ampelos", vid). Uno de estos virus, GLRaV-2, ha sido implicado en los síntomas de incompatibilidad de injerto. Generalmente estos síntomas no se manifiestan a menos que sea injertado un vástago infectado sobre determinadas variedades de portainjerto. Además, un virus que fue llamado previamente "virus asociado a la lesión del tallo de la vid" se halló que estaba altamente relacionado a GLRaV-2 y ahora es conocido como la cepa RG de este virus.

Los proveedores comerciales de los kits de ELISA han desarrollado kits específicos para los tipos GLRaV de -1 a -7.

Fuentes experimentales de ELISA están disponibles para GLRaV -4, -5 y -8, y su disponibilidad comercial mejorará de manera importante la calidad de detección de estos virus. Todos estos virus (excepto GLRaV -6) pueden ser detectados usando RT-PCR.



Foto 2. Las plantas infectadas con la enfermedad de enrollamiento de la hoja son ligeramente más chicas que las sanas. Algunas veces la nervadura principal de la hoja permanece verde. Los racimos de uva son más chicos de lo normal y tienen un menor contenido de azúcar.

COMPLEJO DE MADERA RUGOSA

Cuatro enfermedades diferentes pueden ser detectadas por indexación biológica, pero sólo tres de ellos han sido asociados con infección viral. El listado del tallo de *Rupestris* es causado por el "virus asociado al listado o viruela de tallo de *Rupestris*" (*Rupestris stem pitting associated virus*) (RSPaV, un Foveavirus, de latín "fovea", pequeñas pintas); el estriado del tallo de Kober es causado por el virus A de la vid (GVA, un vitivirus, del latín "Vitis", uva); madera corchosa es causada por el virus B de la vid (GVB, un vitivirus). El síndrome LN33 del estriado del tallo es distinguido por el indexaje biológico, pero no se encontró ningún virus asociado con este síndrome.

Los diferentes síndromes del complejo de madera rugosa son difíciles de distinguir a campo. Los síntomas típicos están relacionados con vides injertadas e incluyen el abultamiento por encima de la unión del injerto y madera con manchas o estrías que pueden únicamente ser vistas luego de remover la corteza. La severidad de los síntomas varía con el portainjerto o la variedad injertada y el tipo de virus, yendo desde un retraso en la brotación al decaimiento de la vid y la muerte. El estrés ambiental y/o la combinación del síndrome de madera rugosa con otras enfermedades puede intensificar los síntomas de la enfermedad.

Un ELISA confiable está disponible para GVA mientras que RSPaV, GVA y GVB pueden detectarse usando RT-PCR. Es interesante destacar que recientemente PCR ha permitido el descubrimiento de una cepa de RSPaV que no causa síntomas sobre el huésped indicador *Rupestris* St. George. El virus

fue encontrado en el indicador original de material vegetal, y no se conoce donde puede haberse originado el que no manifieste síntomas en el huésped indicador.

MOTEADO

Esta enfermedad está caracterizada por manchas cloróticas y translúcidas en las nervaduras de tercer y cuarto orden de las hojas jóvenes y de edad intermedia. Las hojas con un moteado numeroso están contorsionadas y deformadas. Un virus icosaedro, el virus del moteado de la vid (*grapevine fleck virus*- GFKV) ha sido asociado con esta enfermedad. ELISA y PCR están disponibles para la detección del virus del moteado. El indexaje biológico es realizado con *V. Rupestris* Saint George.

Por injertación de un vástago varietal sobre un portainjerto establecido en campo, el viticultor puede estar introduciendo potencialmente uno o más virus cada vez que una nueva variedad es injertada. Es importante para comenzar un viñedo libre de enfermedades, plantas testeadas.

EVALUACIÓN DE OTOÑO

La estación del otoño es el momento perfecto para la búsqueda y detección de ciertas enfermedades características en el viñedo. La manifestación de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad de leafroll a veces son obvios: las hojas enrolladas hacia adentro, volviéndose rojas o amarillas, según el color de uva de la variedad. La coloración de las hojas es más intensa en la base de la canopia y va progresando hacia arriba mientras avanza la estación.

Los virus asociados con la compleja de madera rugosa no producen síntomas, o son menos obvios. Mientras que las plantas madre pueden no manifestar síntomas de infección de virus, síntomas de incompatibilidad de injerto se muestran en un año o dos luego de la plantación, lo que puede ser devastador para el productor. El costo de replantación de un nuevo viñedo puede ser prohibitivo. Además, la replantación añadirá una diversidad de vides de distinto tamaño, afectando negativamente las prácticas culturales en el viñedo.

Es importante prestar atención al aspecto de la vid de las plantas madre y depender de análisis de laboratorio cuando se propaguen o injerten plantas desde un viñedo ya establecido. Esta práctica asegurará futuras plantaciones libres de enfermedades. El uso de la metodología correcta de muestreo para la evaluación es muy importante ya que la concentración del virus varía con la ubicación en la planta. Los productores deberán buscar consejo profesional y tomar ventaja de la evaluación en la temporada correcta para descartar infección en las plantas antes de plantar. No olvidar que un viñedo saludable es de esperarse que viva más de 100 años.

Ph. D. Judit Monis disertará en el curso de Viticultura Práctica organizado por APM & Asociados que se dictará el 30 y 31 de Mayo en Mendoza, Argentina y el 2 de Junio en Santiago, Chile