

NIVEL DE INFECCION Y SANEAMIENTO DEL VIRUS DEL ENTRENUDO CORTO (GFLV) EN EL cv. DE VID PEDRO XIMENEZ EN LA DENOMINACION DE ORIGEN MONTILLA-MORILES (DOMM).

Por: M. Cantos¹, C. Weiland², F. Pérez-Camacho³ y A. Troncoso¹ (*).

1. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. C.S.I.C. Avda. Reina Mercedes 10. Apdo 1052. Estafeta Puerto. 41080 Sevilla. España.

(2) Departamento. CC. Agroforestales. E.P.S. Universidad de Huelva. España.

(3) Departamento de Agronomía. E.T.S.I.A. Universidad de Córdoba. España.

RESUMEN

Mediante análisis por test ELISA de hojas de vides (*Vitis vinifera* L.) del cv. Pedro Ximénez, procedentes de 28 parcelas experimentales distribuidas por la DOMM, se determinó el número de cepas infectadas por el *virus del entrenudo corto infeccioso* (GFLV). Cinco de las parcelas, no mostraron planta virótica alguna; otras siete, presentaron bajo nivel de contaminación (< 15%); en otras cinco parcelas, el número de plantas atacadas estuvo comprendido entre el 15 y el 30%, es decir, ya tuvieron un nivel notable de ataque, y por último, en las 11 parcelas restantes el número de plantas afectadas superó el 30%, lo que se consideró como un grado de infección muy elevado. No se encontró relación entre el número de cepas viróticas y la edad o la densidad de la plantación, o el tipo de portainjerto empleado. Sin embargo, pudieron establecerse agrupaciones territoriales de parcelas con niveles similares de contaminación, lo que pudo estar relacionado con el uso de material, infectado para realizar los injertos y/o la presencia de *Xiphinema index* en la zona, como las causas más importantes en la transmisión del virus.

No obstante la variabilidad indicada en cuanto al porcentaje de plantas viróticas, el conjunto de la DOMM se consideró como bastante afectado. Por ello, interesó el saneamiento del material, lo que se logró a nivel del 92% por cultivo "in vitro" de meristemas. Se observó que la planta saneada creció mejor in vitro que la afectada por entrenudo corto.

Este trabajo ha sido realizado en colaboración con la Dirección General de Investigación y Formación Agraria de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

(*). Autor Correspondiente.

INTRODUCCION

El marco Montilla-Moriles, situado al sur de la provincia de Córdoba, es un área típica del viñedo español. La producción de sus vinos, principalmente generosos, aunque últimamente ha tomado importancia la elaboración de blancos de mesa, está protegida por la denominación de origen Montilla-Moriles (DOMM). El cv. Pedro Ximénez, ocupa una extensión de 11.104 Ha, lo que representa el 90% de la viticultura de dicha zona. Esta variedad da buenas producciones y elevada calidad, en especial en los terrenos altos y sanos.

El virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) es el más extendido, el que causa más graves daños y mayores pérdidas económicas en el viñedo mundial (Ribereau-Gayon y Peynaud, 1986; Krastanova *et al.*, 1995) entre los diferentes virus de la vid. La gran difusión de esta enfermedad se debe a las buenas condiciones hospedadoras de la planta (Coiro *et al.*, 1984) y a la existencia de diferentes vectores de transmisión. Desde hace tiempo, se conoce que el virus se difunde a través del suelo (Rathay, 1882; Pantanelli, 1910 y Petri, 1912). Branias *et al.* (1946) asociaron la proliferación del virus con inoculaciones provocadas por pulgones y cicadélidos. Arnoud (1973), relacionó la difusión de la

enfermedad con la presencia de filoxera. Hewit *et al.*, (1958) demostraron por primera vez la capacidad de los nematodos para transmitir virus vegetales, al descubrir que el *Xiphinema index* actuaba como agente causante del entrenudo corto infeccioso en la vid. Según Das (1966) sólo son necesarios 15 minutos de contacto para que un *X. index* pueda infectarse con el virus y 24 horas para que sea capaz de transmitirlo. Dado que el *X. index* se encuentra en prácticamente todos los viñedos españoles (Weiland y Pérez-Camacho, 1995; del Moral *et al.*, 1998) se puede deducir la importancia de este agente de infección.

Ravaz (1960) indicó que el injerto con material contaminado era otra forma de transmisión del virus. En la situación de muchas DO del viñedo español, en las que se emplea material sin controlar para realizar los injertos de nuevas plantaciones y dada la posibilidad elevada de que dicho material esté infectado, el factor humano puede ser la fuente principal de difusión del virus.

Entre los medios que existen para detectar la presencia del virus del entrenudo corto infeccioso en la planta (Ribereau-Gayon y Peynaud, 1986), el test serológico ELISA (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1981; Clark y Bar-Joseph, 1984; Gugerli *et al.*, 1984; Chu *et al.*, 1989) está especialmente indicado por su rapidez y fiabilidad (Clark, 1981; Golino *et al.*, 1992; Forsline *et al.*, 1996).

Cuando existe un nivel elevado de infección vírica, como ocurre frecuentemente con el entrenudo corto infeccioso, es conveniente disponer de métodos eficaces para el saneamiento de las plantas. La termoterapia (Vuittenez, 1962) y el cultivo in vitro de meristemos (Gifford *et al.*, 1961; Galzy, 1969; Barlass y Skene 1978; Harris y Stevenson 1979) son las técnicas más frecuentemente utilizadas. Cantos *et al.*, (1993) combinaron ambos métodos con muy buenos resultados en el saneamiento del cv. Zalema.

El presente trabajo pretende determinar el nivel de infección y la distribución territorial del virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV), en el cv. de vid Pedro Ximénez en la DOMM, mediante análisis por test ELISA. Además, trata de conocer la respuesta de dicho cv. al saneamiento de la enfermedad por cultivo in vitro de meristemos apicales.

MATERIALES Y METODOS

Se eligieron 28 parcelas con una extensión aproximada de 0.3 Ha, repartidas por la DOMM (fig.1). Como material vegetal para el análisis de la virosis se eligió una hoja por cepa, que ya había alcanzado su tamaño final y situada hacia la mitad del sarmiento (6º nudo). Se tomaron más de 100 hojas-cepa, por parcela. Las hojas, debidamente señaladas, se trasladaron al laboratorio en nevera donde se lavaron 2 veces con agua de la red y dos veces con agua Milli-Q. Una vez limpio el material se inició el análisis por test ELISA (Gugerli *et al.*, 1984). Para ello, se cortaron trocitos del mesófilo de cada hoja que se introdujeron en un tubo eppendorf para ser homogeneizados en presencia de 1.5 cc de tampón de extracción. El extracto de cada hoja se conservó a 20°C y a medida que fue necesario se utilizaron para ser analizados.

Para el saneamiento del material de Pedro Ximénez, se cultivaron in vitro explantos de aproximadamente 2 cm de longitud, obtenidos a partir de sarmientos con síntomas claros de estar infectados por el virus. Para mayor seguridad de que el material a propagar estaba infectado por el virus se analizó mediante test ELISA y solo se cultivó in vitro aquel que dio claramente positivo. Las plantas cultivadas in vitro a partir de los explantos viróticos se volvieron a analizar por test ELISA y de ellas se destacaron meristemos apicales de 0.1-0.2 mm que se volvieron a cultivar in vitro. Las plantas obtenidas se analizaron de nuevo por test ELISA.

Tanto para el cultivo in vitro de los meristemos como de los explantos, se utilizó el medio VID (Troncoso *et al.*, 1990) aunque en el primer caso se le añadió el complejo vitamínico de White (1954). Las condiciones de incubación para ambos tipos de material fueron en cámara de cultivo a 25± 1°C de temperatura, 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación y 16 horas de fotoperíodo. Para el trasplante del material in vitro a condiciones externas se utilizó la técnica propuesta por Cantos *et al.*, (1993).

RESULTADOS Y DISCUSION

Nivel de infección y distribución geográfica de la virosis

En la tabla 1, se indica el número de cepas por Ha (densidad de plantación), la edad de las plantas y el tipo de portainjerto utilizado, como factores que pudieran estar relacionados con la presencia del virus, y el tanto por ciento de cepas viróticas (nivel de infección). Se observó una gran variabilidad en cuanto a este último parámetro. En cinco parcelas no existieron plantas infectadas; otras siete, mostraron presencia del virus en un número bajo de cepas (< 15%); otras cinco parcelas, tuvieron ya un tanto por ciento alto de vides contaminadas (15-30%) y finalmente, en las 11 parcelas restantes, la difusión de la enfermedad fue muy elevada (> 30%) y en algunos casos, extrema. En consecuencia, junto a la variabilidad indicada, también se puede decir que el nivel de contaminación por el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) es bastante alto en el conjunto de la DOMM.

No se observó relación alguna entre el número de cepas viróticas y el número de plantas por Ha. Esto pudo ser debido a las pocas diferencias en la densidad de plantación entre las distintas parcelas, lo que no permitió una gradación suficiente de las mismas por este parámetro. También, a la existencia de causas mas importantes en la difusión del virus como la acción de los nematodos (Hewitt *et al.*, 1958; Cohn *et al.*, 1970; Weiland y Pérez-Camacho, 1995) o el factor humano (Rowhani and Golino, 1995) especialmente por el uso para injertar de material no certificado, tomado directamente de campo y con altas posibilidades de estar virosado. Tampoco se encontró relación entre el número de plantas viróticas y la edad de la plantación, al contrario de lo indicado por Paneque *et al.*, (1999) al estudiar la distribución de la infección por GFLV en el cv. Palomino Garrido Fino del Aljarafe (Sevilla). Posiblemente, la falta de correlación entre la edad de la cepa y el grado de contaminación por entrenudo corto infeccioso en las parcelas aquí consideradas, fuese debida a algo parecido a lo indicado para la densidad de plantación. Es decir, a la similitud de edad de muchos de los viñedos y a la mayor influencia de los otros factores citados. Tampoco se observó una relación clara entre el número de cepas atacadas y el portainjerto correspondiente, aunque entre las parcelas con menor grado de infección abundó mas el portainjerto 110R que el 41B, que fueron los mas usados.

En el mapa de la DOMM (fig 1) se sitúan las parcelas geográficamente y según su nivel de infección. Se clasificaron en tres categorías: infección leve (<15%), infección media (15-30%) e infección elevada (> 30%). Se observa que, con frecuencia, las parcelas con grados similares de ataque, se agrupan en áreas próximas entre sí. Así, de las 12 parcelas con nivel leve de infección, cinco se encuentran en el centro de la llamada Sierra de Montilla, al SE de la ciudad de ese nombre, en lo que constituye una de las áreas mas clásicas y de suelos con mayor calidad vitivinícola de la DOMM (García del Barrio *et al.*, 1980). Otras seis parcelas, se sitúan en áreas circundantes de la ciudad de Moriles, aunque algunas fuera de su término municipal, pero siempre en la misma región natural. Esta área también está formada por suelos con alta calidad vitivinícola (García del Barrio *et al.*, 1980). En el otro extremo, las 11 parcelas clasificadas como fuertemente infectadas por GFLV se pueden agrupar en cuatro áreas principales: Tres parcelas en los suelos muy arenosos de los alrededores de Montemayor y la Rambla; otras tres al SO de Moriles hacia Puente Genil; dos parcelas cercanas a Cabra y por último otras tres en los bordes de la Sierra de Montilla. Las parcelas cuyas cepas mostraron niveles medios de contaminación se sitúan de forma mas dispersa. Las dos formas que se aceptan que favorecen mas la difusión del virus del GFLV, nematodos (Hewitt *et al.*, 1958; Weiland y Pérez-Camacho, 1995) y factor humano (Rowhani and Golino, 1995) pueden explicar la tendencia al agrupamiento de las parcelas con niveles parecidos de infección.

No obstante la variabilidad existente entre el nivel de contaminación por GFLV entre las distintas parcelas, el número de las mismas con proporción media o alta de plantas viróticas es muy elevado, por lo que se puede considerar que en el conjunto de la DOMM el grado de afección por la enfermedad es importante. En consecuencia, interesó abordar el saneamiento del material atacado.

Saneamiento del material atacado

Como primer paso para sanear el material de vid Pedro Ximénez afectado por GLFV, se cultivaron in vitro explantos obtenidos a partir de cepas que mostraban síntomas de la enfermedad. No obstante, para mayor garantía de que se partió de un material virótico, se hicieron pruebas de test ELISA, hasta tener la certeza de que todos los explantos puestos in vitro estaban contaminados por el virus. Las plantas así obtenidas in vitro, se volvieron a someter a test ELISA y se comprobó que todas estaban virosadas. Es decir, que los explantos con virus cultivados in vitro, dieron lugar a plantas cuyas hojas nuevas, formadas in vitro, ya dieron positivo al test ELISA. Este hecho indicó la facilidad y rapidez de transmisión del virus por el interior de los tejidos de la planta en las condiciones favorables del cultivo in vitro. Monis y Bestwick (1996) también indicaron que el cultivo in vitro favorece el desarrollo del virus del entrenudo corto en el material de vid. De estas plantas, se obtuvieron los meristemas que de nuevo se cultivaron in vitro. Como había ocurrido en experimentos anteriores con otras variedades de vid (Cantos *et al.*, 1993; Paneque *et al.*, 1999) los meristemas respondieron muy bien a las condiciones del cultivo in vitro (tabla 2) y aunque con un ritmo de menor crecimiento que cuando se utilizó un explanto (tabla 3) se desarrollaron prácticamente al 100% para regenerar nuevas plantas o tallos aun sin radicar. El tanto por ciento de radicación hasta la fecha que se considera alcanzó un 42% sin haber utilizado un medio de cultivo específico para ese objetivo. El análisis por test ELISA de las plantas obtenidas in vitro, mostró un nivel de contaminación de sólo el 8%, lo que significó un porcentaje muy elevado de plantas sanas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Harris and Stevenson, 1979; Cantos *et al.*, 1993; Paneque *et al.*, 1999 con otras variedades de vid y confirmó las garantías del procedimiento del cultivo de meristemas in vitro para sanear material de vid. Cuando se volvieron a cultivar in vitro explantos obtenidos a partir de las plantas sanas, se observó que el crecimiento de sus tallos fue superior al logrado en los tallos nacidos de explantos viróticos (tabla 3). Es decir, el material contaminado creció menos in vitro que el sano, lo que ya se había observado con otras variedades de vid (Wolpert *et al.*, 1996).

La obtención in vitro de plantas libres de virus a partir de meristemas, frente a lo que ocurrió al cultivar in vitro explantos infectados, cuando se obtuvieron plantas también contaminadas por la enfermedad, indicó que el meristemo estaba aun sin atacar. Es decir, que no obstante la rapidez de infección de la planta in vitro a partir del explanto virótico (las hojas recién formadas de estas plantas dieron positivo a ELISA) el crecimiento apical permitió disponer de material no contaminado, que al cultivarlo in vitro regeneró una planta sana. De este modo se confirmó que el crecimiento del meristemo apical fue superior a la difusión del virus, no obstante las condiciones favorables del cultivo in vitro.

El uso de la técnica de Cantos *et al.*, (1993) para el trasplante del material desde *in vitro* a *ex vitro* permitió la supervivencia de prácticamente el 100% del mismo, y su cultivo en macetas en condiciones de invernadero de disponer de sarmientos sanos para ser utilizados en los nuevos injertos.

Tabla 1. Características y grado de infección por el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) de las cepas de las parcelas seleccionadas en la DOMM.

Parcela	Cepas/Ha	Edad	Portainjerto	% cepas viróticas
1	2500	-	110-R	0
12	3086	-	41-B	0
15	2827	20	110-R	0
20	3636	20	41-B	0
28	3265	7	161-49-C	0
25	3200	25	110-R	8
27	2887	6	41-B	9

13	1600	36	110-R	9
14	1834	35	110-R	9.5
11	2500	5	110-R	10
24	3199	34	161-49-C	12
21	3636	20	41-B	13
5	2500	25	110-R	17
7	2827	20	161-49-C	19
6	2268	10	41-B	20
18	4000	20	110-R	20
8	2667	25	110-R	20
22	3199	25	420 AM	33
23	3199	38	41-B	33
9	2500	30	110-R	36
26	3333	17	161-49-C	40
3	1890	23	110-R	41
16	3000	30	41-B	43
19	3575	14	41-B	46
2	2827	-	110-R	50
10	3996	32	110-R	50
4	2500	26	41-B	67
17	2827	34	41-B	79

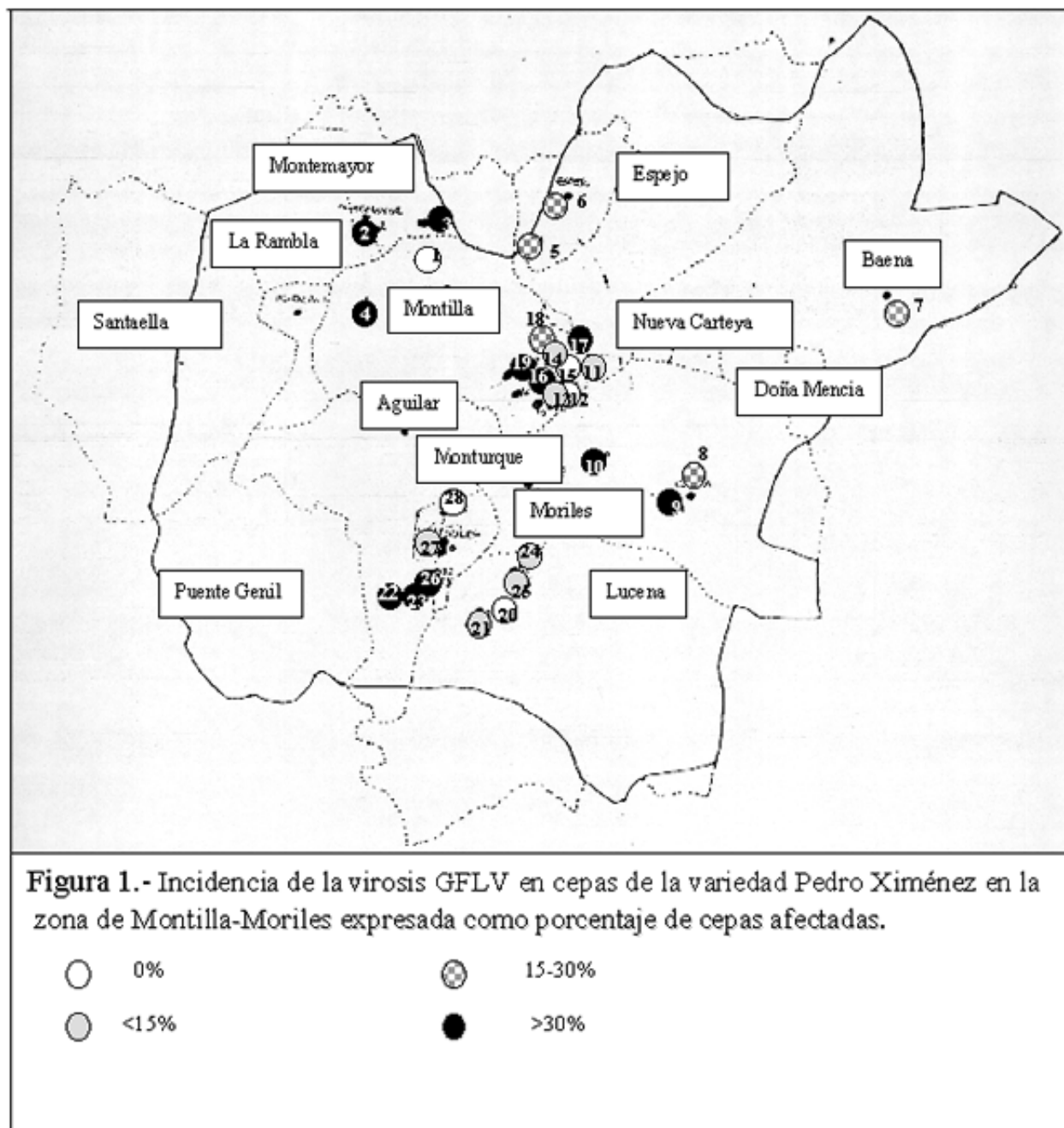
Tabla 2. Desarrollo y nivel de infección por el virus GFLV de meristemas de vid Pedro Ximénez

Días de cultivo	Long. tallo (mm)	Nº de nudos	Radicación (%)	Long. raíz (mm)	Nivel de	Infección (%)
					Plantas de procedencia	Plantas obtenidas
15	5	1.7	0	0		
30	9	2.8	0	0		
45	12	3.9	0	0	100	8
60	15	4.7	25	12		
75	22	5.3	33	30		
90	29	6.3	33	40		

105	34	6.3	42	42		
-----	----	-----	----	----	--	--

Tabla 3. Comportamiento *in vitro* (45 días de cultivo) del material de Pedro Ximénez virótico y limpio de virosis GFLV.

Material vegetal	Procedencia	Infección %	Longitud del tallo (mm)	Nº de nudos	Radicación %
Explanto	Cepas viróticas	100	19	4	43
Explanto	Plantas de meristemos	0	26	5	29



BIBLIOGRAFÍA

Arnaud, G. 1937 Les maladies à virus des plantes. Progr. Agric. Vit., 106, 562-567; 107, 35-38, 86-90, 110-113, 138-141.

Branas, J.; Bernon, G. et Levadoux, L. 1946. Nouvelles observations sur la transmission du court-noué de la vigne. Prog. Agric. Vit 125, 20-25, 42-48, 82-83.

Cantos, M. Liñán, J.; Pérez-Camacho, F. y Troncoso, A 1993. "Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de la virosis entrenudo corto". Actas de Horticultura. 1993. Vol. II, 705-709.

Clark, M.F. y Bar-Joseph, M., 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. Methods in Virology 7, 51-58.

Coiro, M. I. & D. J. F. Brown. 1984. "The status of some plants as hosts for four population of

Xiphinema index (Nematoda: Dorylaimida)". Revue. Nematol,7: 283-286.

Cohn, E.; Tanne, E. and Nitzany, F. 1970. *Xiphinema italiae*. A new vector of grapevine fanleaf virus. Phytopatology 60: 182-2.

Chu, P.W.G., Waterhouse, P.M., Martin, R.R. and Gerlach, W.L. 1989. New approaches to the detection of microbial plant pathogens. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 7, 45-111.

Das, S. 1966. Virus-vector relationships of grapevine fanleaf virus and its nematode vector *Xiphinema index* Thorne and Allen. Ph. D. Thesis, Univ. Calif. Davis, 58 p.

Del Moral, J., Arias, M.; Fresno, J. y Mejías, A. , 1998. El virus GFLV y el nematodo *Xiphinema index* de la vid en Extremadura. Consideraciones para la elaboración de un programa de sanidad contra los mismos. XIX Jornadas de Viticultura y Enología Tierras de Barros.

Forsline,-P.L.; Hoch,-J.; Lamboy,-W.F.; Hu,-J.S.;McFerson,- J.R.; Golino,-D.A.; Gonsalves,-D. 1996. Comparative effectiveness of symptomatology and ELISA for detecting two isolates of grapevine leafroll on graft-inoculated Cabernet franc..Am-j-Enol-Vitic. v. 47 (3) p. 239-243.

Galzy, R, 1969. Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* Scheele sain et court noué cultivé *in vitro* a diferentes temperatures. Am Phytopathol. 1(2)149-166

García del Barrio, I.; Sanz, F. y López, L., 1980. El viñedo, el clima y el suelo de Montilla-Moriles. Ministerio de Agricultura. Madrid.

Gifford, E.M. and Hewitt, W.B. 1961. The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to fanleaf virus from the grapevine. Am. J. Enol. Viticult. 12:129-130.

Golino,-D.A.; Verdegaal,-P.; Rowhani,-A.; Walker,-M.A. 1992. Sampling procedures to find nepoviruses in grapevines need improvement. Calif-Agric. May/June 1992. v. 46 (3) p. 11-12.

Gugerli, P.,Brugger, J. Et Bovey, R.1984. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide.Revue suisse Vitic. Arboric. Hort. vol. 16 (5):299-304.

Harris, R.E. and Stevenson, J.H. 1979. Virus elimination and rapid propagation of grapes *in vitro*. Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 29:95-106.

Hewitt W.B., Raski D.J. et Goheen A.C.1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. Phytopath., 48,586-595.

Krastanova,-S.; Perrin,-M.; Barbier,-P.; Demangeat,-G.; Cornuet,-P.; Bardonnnet,-N.; Otten,-L.; Pinck,-L.; Walter,-B. 1995 Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. Plant-cell-rep. 14 (9) p. 550-554.

Monis,-J.; Bestwick,-R.K. 1996. Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. Am-j-enol-vitic. v. 47 (2) p. 199-205.

Morel, G.; Martin, C. 1952. Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci. Ser. D. 235:1342-1325.

Paneque, P.; Cantos, M. y Troncoso, A. 1999. Nivel de infección por entrenudo corto (GFLV) y saneamiento de la variedad de vid Palomino Garrido Fino en el Aljarafe (Sevilla). III Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in Vitro* de Tejidos Vegetales. Torremolinos. Málaga. Noviembre.

Pantanelli E. 1910. Influenza del terreno sullo sviluppo del roncet o arriciamento della vite. Rendic.

Acc. Lincei., 19, 395-401.

Petri L. 1912 Significato patologico dei cordoni endocellulari nelle vite affette da arricciamento. Rendic.Acc. Lincei., 21, 113-119.

Rathay E. 1882. Die Gabler oder Zweiwippflerleben. Osterr. Botan. Z., 32, 316-320.

Ravaz, L. 1960. Le court-noué. Ann. Ecol. Nat. Montpellier, 11, 294-314.

Ribereau-Gayon y Peynaud 1980. En Tratado de Ampelografía, Ciencias y Técnicas de la viña. Tomo II.368-397.

Rowhani,-A.; Golino,-D.A. 1995. ELISA test reveals new information about leafroll disease. Calif-agric. Jan/Feb 1995. v. 49 (1) p. 26-29.

Sánchez-Vizcaíno, J.M. y Cambra, M. 1981. Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. INIA. MAPA. Madrid.

Troncoso,A., Villegas, A. and Cantos, M. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured *in vitro* with different levels of ammonium nitrate. Plant Nutrition, Physiology and Applications. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp 581-584.

Vuittenez, A. 1962. Essais de guérison de vignes atteintes de dégénérescence infectieuse par thermothérapie. Etudes Virologie Appl. 3: 23-26.

Weiland, C. and Pérez-Camacho, F. 1995. Nematodes vectors of virus in the "Denominacion de Origen condado de Huelva. acta Horticulturae N°388 pág:31-35.

White, P.R. 1954. The cultivation of animal and plant cells. Ronald. New York.

Wolpert,-J.A.; Szychowski,-J.A.; Semancik,-J.S. 1996. Effect of viroids on growth, yield, and maturity indices of Cabernet Sauvignon grapevines. Am-j-enol-vitic. v. 47 (1) p. 21-24.