

PUNTOS RESALTANTES DEL ENCUENTRO 2006 DEL CONSEJO INTERNACIONAL PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES DE LA VID PROVOCADAS POR VIRUS O MICROORGANISMOS SIMILARES A VIRUS (ICVG)

Judit Monis¹ y Nuredin Habili²

¹ STA Laboratories, Gilroy, CA.

² Waite Diagnostics, University of Adelaide, South Australia.

La implantación y conservación en el tiempo de viñedos libres de virus son tareas que requieren un delicado esmero y que se ven retribuidas en la producción de uvas de alta calidad, rendimientos sostenidos y viñedos longevos. Sabiendo que un viñedo añoso se traduce en una más alta calidad estable en el tiempo, y que al contrario de lo que ocurre con los frutales, los viñedos más antiguos son los que ostentan un mayor precio por las características productivas mencionadas, científicos de todo el mundo trabajan día a día para obtener información de las formas de acción y dispersión de los virus en los viñedos, en búsqueda de métodos de limpieza de materiales infectados. La disposición de stock de material madre libre de virus, o en su defecto de métodos de eliminación de virus del material ya infectado, son elementos claves para la continuidad de la industria. Investigadores de todo el mundo se reúnen para compartir los progresos realizados en torno a esta temática. Les presentamos aquí los puntos resaltantes del último encuentro de esta especialidad.

The establishment and maintenance along the time of healthy free virus vineyards are heavy labours that require a delicate devotion and which are traduced in high quality grapes production, stable yields and long lasting vineyards. It is known that old vineyards means high and more stable quality in the time, and reversely that occurs to fruit trees, more aged is a vineyard, more value it has, because of its particular productive features, above mentioned. Therefore, researchers from the entire world work day by day to obtain information about viruses spread and detrimental action in vineyards, looking for virus elimination methods from the infected material. Free virus mother material stocks and virus elimination methods from infected vines are key points to guarantee the continuity of grapevine industry. Researchers from all over the world have meetings to share the last progress related to this subject. We present here the highlights of the last meeting of this speciality

Palabras claves: virus, enfermedad, ArMV, GFLV, Raspberry ringspot virus (RpRSV), GLRaV-2 y -3, GVA, GVB, y RSPaV, Vitis vinifera, vid.

Key words: virus, disease, ArMV, GFLV, Raspberry ringspot virus (RpRSV), GLRaV-2 y -3, GVA, GVB, y RSPaV, Vitis vinifera, grapevine.

El 15^o Encuentro del Consejo Internacional para el Estudio de Enfermedades de la vid producidas por virus o microorganismos semejantes a virus (ICVG) fue realizado en Stellenbosch, Sudáfrica, entre el 3 y 7 de Abril de 2006. El Encuentro del ICVG es llevado a cabo cada tres años alternando entre los hemisferios norte y sur. El próximo encuentro será en el 2009, ya sea en Francia o Canadá. Se presentaron 109 papers y posters. Aquí abajo se presentan en resumen los puntos destacados para cada virus y/o grupos de virus que son de importancia económica para la industria de la vid.

Aunque la conferencia se enfoca principalmente a los virus que infectan vides, históricamente los fitoplasmas también han sido incluidos. Esto es porque, antes de su caracterización (también conocidos como organismos similares a micoplasmas), se pensó que estaban asociados a los virus. Un total de 25 papers (23%) abarcaron el tema de los fitoplasmas de la vid. Los lectores pueden obtener una copia gratuita del libro de resúmenes de la siguiente dirección de internet:

<http://www.icvg.ch/archive.htm>

Giovanni Martelli, Presidente del ICVG, comenzó el encuentro con una revisión del progreso en la investigación de los virus de la vid en los últimos tres años. La nueva directiva regulatoria de la Comunidad Europea (UE), que recomienda "el menor nivel posible de organismos dañinos en el material de propagación", es de interés y relevancia para la certificación de la vid y los programas de limpieza de material de reserva.

Sin embargo el anexo técnico publicado en el 2005 sobre la vid causó frustración entre la comunidad científica de la Unión Europea, puesto que sólo enumera a los siguientes como organismos perjudiciales: *Grapevine Fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) -1 y -3, y *Grapevine fleck virus* (GFkV) (este último virus sólo para material de portainjertos).

El Ministerio Italiano de Agricultura ha diseñado una nueva directiva que es más estricta y establece que además de los virus mencionados arriba las vides deben estar libres de GLRaV-2 y de los virus asociados con el complejo madera rugosa con excepción del virus asociado a *Grapevine Rupestris stem-pitting* (GRSPaV). En los próximos meses, el ICGV trabajará en el desarrollo de un documento compilatorio que explique los efectos detrimentales de los distintos virus para persuadir a la Unión Europea y otras agencias reguladoras a desarrollar regulaciones más exigentes.³¹



Figura 1. Crecimiento retardado de una vid joven de Chardonnay cuyo análisis resultó positivo para el virus del leafroll de la vid tipo 2 (GLRaV-2). Las vides sanas en el fondo resultaron negativas al análisis para el virus.

Virus asociados a Leafroll

Los diversos reportes de variantes de secuencia de "aislados o cepas" de GLRaV-1, -2, -3, -4, GFLV, GRSPaV y GFkV confirman que la variabilidad genética es común entre los virus que infectan a las vides.^{2,3,18,21,33,41,45} Un estudio sugirió eventos potenciales de recombinación en las infecciones de GLRaV-1.³³ Se sabe que el GLRaV-2 está asociado con la incompatibilidad de injerto. Evidencia adicional que relaciona al GLRaV-2 con incompatibilidad de injerto fue provista por C. Pirolo.³⁸

Infecciones simples y mixtas de las variantes de GLRaV-2 fueron descritas en un estudio⁴. El estudio mostró efectos de las distintas cepas de GLRaV-2 solo o en combinación mostrando los típicos síntomas de leafroll incluyendo la incompatibilidad de injerto y aumentando la mortandad⁴. El daño causado por las variantes de GLRaV-2 fue más severo sobre los portainjertos Kobber 5BB, Teleki 5C, y 1103 Paulsen. En Argentina, fue reportado un efecto detrimental y alta incidencia de la enfermedad del GLRaV-2 en Cabernet Sauvignon⁴.

La caracterización de las dos variantes de secuencia de

GLRaV-4,⁴¹ provee más información que apoya el trabajo hecho en el USA lab. Por lo tanto, se encontró una cercana relación entre GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, y GLRaV-9. Esto suscita la pregunta: deberían estos virus ser consideradas cepas del mismo virus o virus distintos? En la reunión se propuso que la información serológica, molecular y de microscopía electrónica debería estar disponible antes que un nuevo virus "leafroll" pueda ser nombrado.

Vitiviruses

GVA fue detectado en vides de Shiraz y Merlot mostrando la Enfermedad del Shiraz (Figura 2), un desorden reportado de ocurrir en Sudáfrica y Australia.¹⁹



Figura 2. Síntomas de la enfermedad australiana del Shiraz sobre una vid de Shiraz infectada con el Virus A de la Vid.

Un estudio llevado a cabo en Sudáfrica mostró que sólo las variantes específicas de GVA están asociadas con la enfermedad del Shiraz y que algunas de las variantes de GVA están latentes en Shiraz.¹³ Estos resultados son distintos de los estudios en Australia que muestran una fuerte correlación entre la presencia de GVA y los síntomas típicos de la enfermedad del Shiraz.¹⁷ Específicamente, el estudio mostró que todas las vides de Shiraz analizadas que dieron positivo para GVA manifiestan más tarde síntomas de la enfermedad del Shiraz. Además, el estudio indica que la enfermedad se difunde naturalmente. Parece que la enfermedad del Shiraz australiano es distinta de la enfermedad sudafricana en que esta no mata las vides dentro de los cinco años de inspección (Habibi, no publicado).

Se notificó la secuencia completa del genoma del virus D de la vid (GVD), un virus asociado con los síntomas de madera rugosa corchosa. GVD parece ser más parecido a GVA que a GVB, apesar que la proteína expresada de ORF2 de GVD parece ser única.

Dos reportes independientes, ambos de Italia describieron la presencia de una gran asociación entre *Grapevine Rupestris stem pitting virus* (GRSPaV) y la enfermedad de la necrosis de nervaduras de la vid (GVND).⁴ Esta información es importante, especialmente para Australia y Nueva Zelanda puesto que GVND es una enfermedad cuarentenaria, mientras que el "virus asociado" está ampliamente difundido en las vides del mundo entero. M.F. Lima reportó que el GRSPaV es transmitido por semilla en la *Vitis vinifera* (hasta el 14%).²³

Fitoplasmas

El agente europeo del amarilleo de las vides, Flavescencia dorada, fue reportado por primera vez en un viñedo del sur de Suiza, en una región donde el vector de las hojas, *S. titanus*, está bien establecido.¹⁵ Un informe sobre la recuperación de plantas luego de la infección por fitoplasmas fue reportado por Rita Musetti quien especuló que el aumento sistémico del H₂O₂ antioxidante puede jugar un rol en la recuperación de plantas de una infección de fitoplasmas.³⁵ Giovanni Martelli argumentó que la clasificación y denominación de los distintos grupos y subgrupos de fitoplasmas están tornándose muy complicado, y que algo debe hacerse al respecto.

Diagnóstico

Un par de reportes relacionados al diagnóstico de enfermedades de la vid se enfocaron en la detección "universal" o de amplio espectro de los distintos patógenos de la vid. Se concluyó que la PCR-RT múltiple para la detección simultánea de los virus de la vid, es rápida y puede reducir drásticamente el número de indicadores en las pruebas biológicas.^{6,8,10,11}

Sin embargo, nuestra experiencia en Waite Diagnostics (Sud Australia) sugiere que la sensibilidad de la detección para cada virus individual es reducida en el sistema múltiple (Habili, no publicado). De alta importancia cuarentenaria es la aplicación de la detección de subgrupos específicos de nepovirus, incluyendo a GFLV y ArMV.⁶

El análisis de material de vides posterior a su ingreso en países donde los nepovirus son cuarentenarios será facilitado si la metodología se vuelve adaptable a los distintos laboratorios alrededor del mundo. A pesar de que, un ensayo preliminar resultó no ser exitoso (Monis, no publicado) sugiriendo la necesidad de optimización de un método local, es interesante notar que en el caso de diversos virus de la vid, los primeros de diagnóstico publicados requirieron ser modificados en nuestros laboratorios (Monis y Habili, no publicado) con muestras locales de vid para que fueran útiles. Esto puede ser explicado por la variación genética en secuencias específicas de los aislamientos de virus o razas en distintas regiones tal como fue comentado por diversos investigadores en este encuentro.

La identificación de tres especies de cochinillas harinosas por PCR múltiple facilitará la identificación de especies capaces de transmitir enfermedades virales.⁴⁰

El desarrollo de protocolos moleculares para la detección confiable de fitoplasmas es aún un desafío. Se presentaron pruebas de PCR simple y múltiple en tiempo real para la detección de fitoplasmas.¹¹ Distintas razas de fitoplasmas podrían ser detectados usando los primers designados para los genes *tuf*, que parecen ser más específicos que el gen 16S ARNr conservado.³²

Usando cebadores (primers) específicos, P.A. Magarey detectó el amarilleo australiano de la vid en hospederos distintos de la vid, incluyendo tres especies de malezas que habitan en las tierras pantanosas que rodean a los viñedos.²⁴ Un informe sobre el desarrollo de un sistema de microarreglos para la detección de importantes virus de la vid promete una alternativa poderosa y un método de diagnóstico rápido.⁹

Efectos sobre la calidad de uva y vino

Numerosos papers reportaron sobre el efecto y ventajas de la eliminación de virus en el rendimiento de la vid y la calidad del vino. Los estudios sustentan que viñedos sanos son capaces de producir mayores cantidades (rendimiento) y calidad de uvas que puede traducirse en una mejor calidad de vino. El uso de nuevos reactivos para la quimioterapia sobre la eliminación de los virus de la vid parece ser prometedor. Sin embargo, no se presentaron datos de los efectos potenciales del tratamiento (tales como juvenilidad, mutaciones, etc) sobre vides maduras.³⁶

Un reporte de Italia establece que la eliminación del GFLV aumenta significativamente la fertilidad de las yemas y el rendimiento de las uvas medido como mayor peso del racimo.²⁵ Los estudios realizados en el mismo laboratorio concluyeron que la actividad fotosintética y de nutrición fue incrementada con la eliminación del GLRaV-1 y GVA que se traduce en mayores rendimientos.²⁶

Investigación en Francia mostró que vides de Chardonnay previamente infectadas con GLRaV-1, -2, -3, GfKv y GVB sometidas a la eliminación de virus usando terapia térmica y cultivo de meristemas, mostraron un incremento del vigor, producción de fruta, y contenido de azúcar (9% de aumento) mientras que la acidez del jugo se redujo (3% de disminución).²² La calidad de la fruta fue mejorada más significativamente cuando GLRaV-2 fue eliminado de esta variedad (ver también Figura 1).

Un estudio enfocado en la calidad de la uva determinó que las vides de Moscato blanco sometidas a la eliminación del GLRaV-3 tuvo efectos beneficiosos en el aroma del vino producido (mayores sólidos solubles y mayores cantidades de terpenos libres y ligados), y mayor producción de fruta.²⁷

Otro estudio con un clon de la variedad Albarola reportó una canopia mejorada, una mejor maduración, mayor sólidos solubles y menor acidez titulable.²⁸ Los síntomas del mosaico angular de la Vid fueron eliminados en las plantas regeneradas usando una combinación de cultivo de puntas de meristemas y termoterapia.¹⁴

Biología

M. Fuchs realizó una revisión acerca de los avances y proyecciones de la resistencia transgénica.¹² Para resumir muchos cultivares de vid han sido transformados experimentalmente con genes que confieren resistencia derivada de patógenos (PDR), especialmente de una proteína de la envoltura (CP), proteína de movimiento (MP), ya sea traducible o no traducible, sentido o antisentido, formas simples o múltiples del virus.

Se ha trabajado sobre los siguientes virus: ArMV, GFLV, Raspberry ringspot virus (RpRSV), GLRaV-2 y -3, GVA, GVB, y GRSPaV. Los cultivares de *Vitis vinifera* incluyen a: Blaufrankish, Chardonnay, Lumassina, Nebbiolo, Red Globe, y Russalka.

Las variedades de portainjertos transformadas incluyen a: 3309C, Kobber 125-AA, Teleki 5C, 101-14 MGT, Kobber 5BB, 41B, *Vitis rupestris* variedad de Lot, y *Vitis riparia* Gloire de Montpellier. Las líneas transgénicas de vides transformadas con genes CP de GVA y de GVB mostraron resistencia parcial a la infección del virus mediante transmisión por

cochinillas harinosas de la vid. La resistencia fue mayor para GVB que para GVA.

Dispersión del virus

En relación a la epidemiología de virus de la vid, se llevaron a cabo estudios para determinar la dispersión del GLRaV-2 y la dispersión de las cochinillas de la vid, sus vectores virulentos, en Sudáfrica. Se encontró una alta correlación entre el número de vides infectadas por leafroll presentes en un viñedo y el número de nuevas infecciones. Esto muestra la importancia de la presión de la enfermedad. La dispersión es más importante a lo largo de la misma hilera, sugiriendo que la dispersión ocurre de una vid infectada a la adyacente confirmando lo que ya fue reportado anteriormente.¹⁶

La dispersión de cochinillas harinosas de la vid por sus propios medios, equipamiento de campo, pájaros, trabajadores o viento requiere de mayor estudio y contribuiría a la dispersión del virus a largas distancias.

Las prácticas sanitarias (períodos de barbecho, sanitización del equipamiento, protección, etc) están siendo evaluadas actualmente para determinar sus efectos sobre la reducción de la dispersión desde viñedos adyacentes hacia viñedos sanos. N. Douglas y K. Kruger reportaron que aún un solo individuo de dos especies de cochinilla, *Planococcus ficus* o *Pseudococcus longispinus* eran capaces de transmitir el virus GLRaV-3 a vides sanas en Sudáfrica.⁷ Todos los estados de desarrollo de *Planococcus citri* fueron vectores eficientes del virus GLRaV-3 en España.⁵

La conferencia incluyó dos viajes a campo para observar el comportamiento de las selecciones clonales con el objetivo de mantener los viñedos libres de virus. Los delegados visitaron VitiTech, una empresa que produce stock de núcleos y madres (libre de patógenos) para la distribución a los viveros sudafricanos. El gobierno, la universidad y el personal de la industria se han unido para trabajar juntos para solucionar la dispersión del virus GLRaV-3 en los viveros sudafricanos.

Reconocimiento:

Nuredin Habili agradece al South Australian Vine Improvement Inc. (SAVIl) por su soporte financiero parcial para asistir a la conferencia del ICVG en Stellenbosch, Sudáfrica. Se les agradece a todos los miembros del comité organizador del encuentro del ICVG, quienes realizaron un gran trabajo.

Recibido: Octubre 2006

Aceptado: Noviembre 2006

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

Referencias:

- 1-Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2006. Molecular Characterization of Grapevine Leafroll Associated Viruses -4 and -6. Extended Abstracts 15Th ICVG Meeting, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006, p30-31.
- 2-Angelini et al. 2006 ibid. p148.
- 3-Bertazon et al, 2006 ibid. p75
- 4-Borgo et al, 2006 Ibid. P75.

- 5-Bouyahia et al. 2006 ibid. pp77 & p231
- 6-Cid et. al, 2006 ibid p252
- 7-Digiario and Elbeaino 2006 ibid. p113
- 8-Douglas and Kruger 2006 ibid p191
- 9-Dovas et al., 2006 ibid. p115
- 10-Engel et al., 2006 ibid. p118
- 11-Faggioli and La Starza 2006 ibid. p120
- 12-Fillipin et al., 2006 ibid. p110).
- 13-Fuchs et al. 2006 ibid. p54
- 14-Goszczynski, 2006 idid. p72
- 15-Grammatikaki et al. 2006 ibid. p153
- 16-Gugerli 2006 ibid. p96
- 17-Habili et al.,1995. Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Australia. *Phytopathology* 85: 1418-1422.
- 18-Habili, N. 2006. The association of Grapevine virus A with Australian Shiraz Disease and its apparent spread in a commercial vineyard. Extended Abstracts 15Th ICVG Meeting, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006, p203-204.
- 19-Habili, N and Bogaz, H. 2006 ibid. p207.
- 20-Habili, N. and Randles, J. W. (2004). Descriptors for Grapevine Virus A-associated syndrome in Shiraz, Merlot and Ruby Cabernet in Australia, and its similarity to Shiraz Disease in South Africa. The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker 488: 71-74. Haviv et al. 2006. The P10 of Grapevine virus A affects pathogenicity on *Nicotiana benthamiana* plants. Extended Abstracts 15Th ICVG Meeting, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006, p69-71.
- 21-Jooste and Goszczynski 2006 ibid. p32
- 22-Komar et al. 2006 ibid. p134
- 23-Lima et al. 2006 ibid. p245
- 24-Magarey et al., 2006 ibid. p205
- 25-Malosini et al., 2006a ibid. p226
- 26-Malosini et al., 2006b ibid. p132
- 27-Mannini et al., 2006a ibid. p136
- 28-Mannini et al., 2006b ibid. p228
- 29-Marn and Mavrik, 2006 ibid. p266
- Masri et al., 2006 ibid. p49
- 30-Martelli 2006 ibid. p13
- 31-Maixner, 2006 ibid. p86
- 32-Mikona and Jelkmann, 2006 ibid. p28. Monette, PL & James, D. 1990: The use of *Nicotiana benthamiana* as an herbaceous receptor host for closteroviruses from leafroll-affected grapevines. *American Journal of Enology & Viticulture* 41: 201-203.
- 33-Musseti et al. 2006. The recovery of grapevine from phytoplasmas: variation of antioxidant status in leaf tissues. Extended Abstracts 15Th ICVG Meeting, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006, p100.
- 34-Panatoni et al., 2006 ibid. p139
- 35-Pietersen, 2006 ibid. p126
- 36-Pirolo et al., 2006 ibid. p242
- 37-Rosa et al. 2006 ibid. p79
- 38-Saccaggi et al. 2006 ibid. p124
- 39-Saldarelli et al, 2006 ibid. p246
- 40-Santos et al., 2006 ibid. p248
- 41-Sciancalepore, et al., 2006 ibid. p250
- 42-Soto et. al., 2006 ibid. p260
- 43-Talenca et al., 2006 ibid. p258
- 44-Virscek Marn and Mavrik, 2006 ibid. p266
- 45-Wetzel et al., 2006 ibid. p108
- 46-Zhou et al., 2006 ibid. p67