
ANÁLISIS DE LAS ENFERMEDADES DE LA VID EN EL VIÑEDO

Ph.D. Judit MONIS

STA Laboratories, Gilroy, CA

INTRODUCCIÓN

El análisis de las enfermedades de la vid se ha vuelto común en la actualidad debido al rápido incremento de los costos de inversión de los viñedos y la conciencia cada vez mayor acerca de las enfermedades causadas por la epidemia de Filoxera de los años 80 y las epidemias subsiguientes provocadas por otros agentes causantes de enfermedades (y debido al desarrollo de la tecnología y las posibilidades de analizar rápidamente). Pero es posible que los productores se sientan abrumados por algunos temas confusos relacionados con el análisis. ¿Se debe analizar antes de plantar, en el viñedo luego de la implantación, o en ambos casos? ¿Qué se debe analizar y cuándo?

Una vez que se realiza el análisis, la interpretación de los resultados es de igual importancia para la poder tomar las mejores decisiones acerca del manejo de los viñedos. Los productores pueden tener interés en analizar las vides para determinar la presencia de agentes patógenos (o agentes causantes de enfermedades) que pueden tener un impacto en la implantación de los viñedos, la calidad de las uvas para la producción de vino, los costos de producción y que finalmente pueden causar el deterioro y muerte del viñedo.

La propagación documentada de ciertas especies de virus que causan el enrollamiento de las hojas (leafroll) en Australia⁵, Argentina², Europa¹, Sudáfrica⁶, y más recientemente en California³ es un claro ejemplo de la importancia de saber no sólo que el viñedo está infectado sino además cuáles son los agentes causantes de enfermedades que tiene el viñedo. A pesar del tiempo transcurrido, hay estudios en progreso para determinar la eficacia de tratar los viñedos infectados con virus mediante el uso de insecticidas sistémicos o la remoción de la vid (ya sea mecánicamente o luego del tratamiento con glifosato) para controlar la propagación del virus del enrollamiento de la hoja de la vid-3 en Sudamérica. G. Pieterse⁸ hace un resumen de las estrategias para el control de la propagación de las enfermedades y el avance de la investigación.

Es también importante determinar con precisión los problemas en el viñedo antes de la replantación. Ciertos agentes patógenos pueden sobrevivir en el suelo o en las raíces residuales de las vides por largos periodos de tiempo y pueden reinfectar (servir como inoculador) el nuevo viñedo. Saber qué es exactamente lo que causa el problema en el viñedo y tomar medidas preventivas ayuda a prevenir (minimizar) el restablecimiento de agentes causantes de enfermedades.

Este trabajo detalla las razones más comunes para el análisis de las vides, la interpretación de los resultados de laboratorios, y los temas acerca de confiabilidad de los análisis y estrategias para analizar. El propósito de este artículo es brindarle al lector la información necesaria para la toma de decisiones con respecto a las materiales para la plantación, la remoción y reemplazo, y operaciones de injerto en la parte superior (top-working) para crear y mantener un viñedo saludable.



¿POR QUÉ ANALIZAR LAS VIDES?

Los profesionales expertos en vides las analizan por diversas razones: 1) decisiones con respecto a la plantación y propagación; 2) toma de decisiones acerca de operaciones de injerto en la parte superior; 3) decisiones acerca de la adquisición de viñedos; y 4) el estado de salud de los clones favoritos previo a la eliminación o propagación de la enfermedad. En general los análisis de laboratorio se realizan para determinar el estado de salud o enfermedad de las vides. Por ejemplo, muchos productores realizan análisis en sus vides para saber qué es lo que está causando los problemas en las vides—como un retraso para que se abran los brotes, deterioro, maduración desigual de las uvas, o baja producción.

Hay situaciones específicas en las que se recomienda el análisis. Primero, el análisis se recomienda al momento de tomar decisiones de plantación. Se deben dar muestras de la vid “madre” para que se analice la presencia de agentes patógenos dañinos. De acuerdo a los resultados de los análisis, se rechazan o se plantan las vides.

En segundo lugar, a los viñedos frecuentemente se les realizan operaciones de injerto en la parte superior para cambiar la variedad de uva, garantizada por las condiciones de mercado. Saber el estado de enfermedad del antiguo y del nuevo vástago brinda información acerca del potencial de éxito de una cierta combinación con el porta injerto.

En tercer lugar, los productores deben analizar sus clones favoritos para determinar el estado de salud antes de usar tratamientos para la eliminación de enfermedades. Finalmente, se analizan muestras de las vides para saber su rendimiento potencial y la longevidad del viñedo como una condición para la compra cuando el viñedo está en venta.

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS

Es importante tomar las muestras más significativas para permitir que el laboratorio detecte la presencia de agentes patógenos virales. Cualquiera sea la razón para la realización del análisis, se debe tener una metodología o estrategia de muestreo científico bien planeada para obtener un verdadero beneficio del proceso. En la mayoría de los casos, se hará un muestreo de un porcentaje limitado de las vides.

Es de gran importancia analizar tanto el vástago como el porta injerto. Muchos productores someten para el análisis de laboratorio injertos de banco (vides injertadas en criaderos y cultivadas en el campo por uno o dos años). Se deben presentar muestras tanto del vástago (clon) como del porta injerto para que obtener una óptima detección de agentes patógenos.

Esto es de especial importancia cuando se realiza un análisis para detectar la presencia de virus asociados con enfermedades como el enrollamiento de la hoja y rugosidad de la madera. Estos virus se diseminan lentamente en la vid y pueden no haber tenido suficiente tiempo para diseminarse (o acumularse) desde el vástago o porta injerto infectado por lo que pueden no detectarse utilizando los métodos de análisis disponibles.

Aún realizando este tipo de práctica, puede ser difícil detectar la presencia de ciertos virus en injertos de banco. Por lo tanto es importante analizar el vástago y porta injerto antes de realizar el injerto. Esto hace que el laboratorio pueda tomar muestras de secciones maduras de la vid, lo que mejora la detección de muchos virus que se encuentran en bajas concentraciones.

Una práctica aún más efectiva sería analizar la vid madre de la que se sacan los cortes. Es importante evaluar al vástago y porta injerto madre visualmente durante la estación de cultivo. Este análisis visual ayudará a realizar de mejor manera la selección de las muestras teniendo en cuenta vides sospechosas o categorías de vides sospechosas. Se registrará la ubicación exacta de las vides a analizar y se recolectarán y analizarán las muestras que representan las diferentes categorías de síntomas en la estación correcta.

Cuando se realizan operaciones de injerto en la parte superior de un viñedo



establecido, la razón para analizar tanto el material existente como el nuevo es obvia: sería muy malo si, teniendo en cuenta todo el esfuerzo que se pone en el proceso, se re infectara la varetta limpia al unirla a un porta injerto infectado o viceversa. En general las operaciones de injerto en la parte superior se realizan sin tener conocimiento previo del estado de enfermedad de un viñedo establecido o del vástago nuevo. Realizar operaciones de injerto en la parte superior de un viñedo existente sin realizar un análisis apropiado es un riesgo innecesario.

Se aconseja que los productores analicen tanto la vid original (la porción que queda en el campo) como el origen de la nueva varetta. Hacer un rastreo del origen de las vides para obtener información acerca de la vid madre en el criadero o el viñedo es tan importante como la estrategia de muestreo sugerida arriba. Esto le permite al productor o al personal del criadero poder rastrear el origen en el caso de tener problemas.

Muchas combinaciones de vástago y porta injerto pueden no presentar síntomas inmediatamente. Los síntomas se pueden presentar uno o dos años después de realizadas las operaciones de injerto en la parte superior. En algunos casos la presencia de agentes patógenos en la vid original combinados con un segundo agente patógeno en el nuevo vástago puede producir síntomas de enfermedad severos luego del injerto.

Se deben hacer inspecciones visuales frecuentes y muestreo de vides para monitorear el estado del viñedo. Se deben desarrollar metodologías estadísticas para el muestreo de las vides. El número de muestras y tipo de tejido (hojas, ramas, etc.) dependerá de la metodología de análisis y los agentes patógenos que se quieren detectar.

REQUISITOS DE MUESTREO

La sensibilidad y exactitud del análisis se incrementan si se siguen las metodologías de muestreo correctas. La sensibilidad en la detección de los agentes patógenos depende de los métodos utilizados para el diagnóstico pero también se ve influenciada por la estación y la parte de la vid de la que se toman las muestras.

Conocer la ubicación del agente patógeno (partes de la planta donde se encuentran los agentes patógenos específicos) mejorará las posibilidades de detección. En consecuencia, los lineamientos para el muestreo dependerán del agente patógeno a ser detectado. Ver lineamientos para muestreo estacional para la detección de agentes patógenos más importantes de la vid en la Figura 1 y el texto que se encuentra a continuación. Se deben recolectar y analizar en laboratorio las porciones del tallo, tronco, cordón, y raíz con síntomas distintivos.

Cuando existe preocupación acerca de agentes patógenos como *Agrobacterium vitis*, se deben recolectar la corona o porciones aéreas de la vid durante todo el año.

Cuando se realiza un análisis para la detección de *Xylella fastidiosa*, el agente causante de la enfermedad de Pierce, se deben tomar muestras del tallo y de los peciolo de las hojas en la porción basal de la vid a partir de fines del verano y hasta fines del otoño.

Para detectar el virus de la hoja en abanico (fanleaf virus) y otros virus transmitidos por nematodos, se deben tomar muestras de las puntas de los brotes a principios de la temporada de cultivo. Para otros virus como el de enrollamiento de la hoja o el de la rugosidad de la madera se deben tomar muestras del tronco, cordón, o ramas desde principios del otoño y durante todo el estado de letargo. Combinar muestras de dos o más viñas en una sola muestra para analizar no es recomendable ya que la sensibilidad de detección se puede ver comprometida y arrojar resultados confusos.

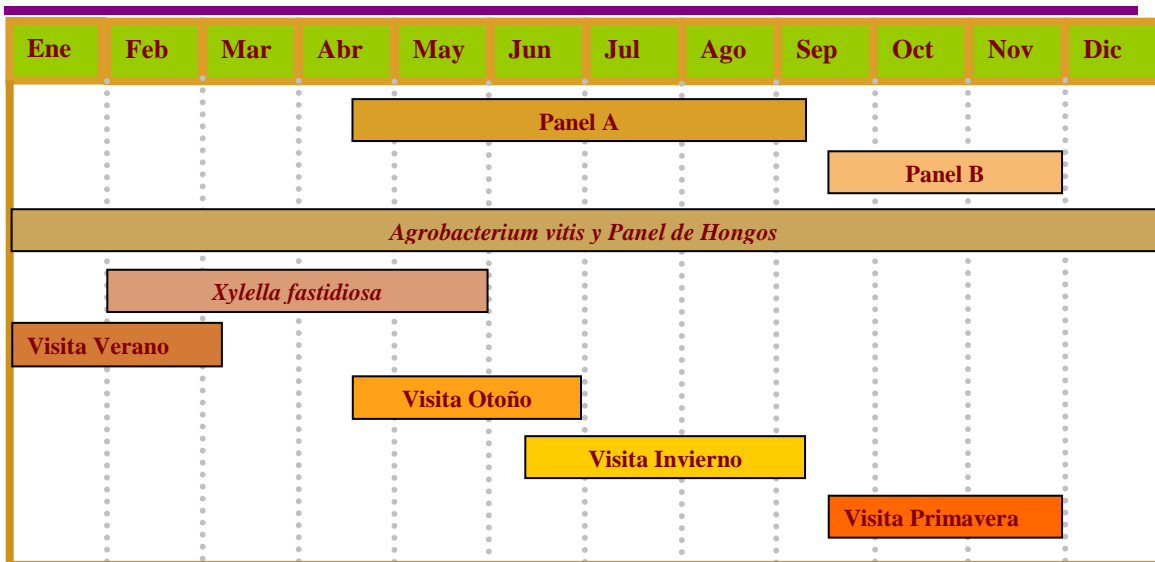


Figura 1: Calendario de tests de diagnóstico en vid y visitas de campo.

Panel A: *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV-) 1, 2 (incluye GLRaV-2 RG), 3, 4, 5, 6, 7, 9, *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine Rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV -incluye la cepa Syrah), *Grapevine fleck virus* (GFkV); Panel B: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), and *Tomato ringspot virus* (ToRSV); Panel de Hongos: *Phaeoacremonium spp.*, *Phaeomoniella spp.*, *Cylindrocarpon spp.*, *Botryosphaeria spp.*, y otros.

ESTUDIO—LA IMPORTANCIA DE UN MUESTREO APROPIADO— DISTRIBUCIÓN DE VIRUS

Muchos profesionales de la vid se han preguntado por qué los resultados de los análisis son tan diferentes cuando se sometan muestras similares a distintos laboratorios. Esto no es sorprendente. Las metodologías de análisis pueden variar de laboratorio a laboratorio. Se ha informado que la distribución del virus varía dentro de la misma vid. J. Monis y R.K. Bestwick han demostrado que los virus asociados al enrollamiento de la hoja no se distribuyen uniformemente en las vides.⁷ El estudio también mostró que el lugar de la vid del que se toman y analizan las muestras es crucial. Este estudio utilizó el método ELISA (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima).

Aunque el uso de RT-PCR (del inglés reverse transcription polymerase chain reaction- Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la polimerasa) ha mejorado enormemente la sensibilidad para la detección de virus, los mejores resultados se obtienen cuando se toman las muestras correctamente y en la época del año apropiada. En resumen, los virus de las vides pueden detectarse de forma adecuada en los tejidos de las hojas, ramas, cordón y tronco. Sin embargo, la concentración de los diferentes virus varía ampliamente en porciones diferentes de la vid dependiendo de la familia del virus o grupo taxonómico.

La Figura II muestra la distribución del virus del enrollamiento de la hoja de la vid-1 en estado latente. Se tomaron tejidos a lo largo de la rama y se analizaron. Las áreas oscuras de la figura representan las partes de la vid en las que no se detectó virus. En las áreas de coloración intermedia, se detectó el virus en baja concentración.

La Figura II ayuda a explicar la variación de los resultados de los análisis en el mismo laboratorio y entre distintos laboratorios. Por lo tanto, se deben someter a análisis múltiples muestras para asegurar que los resultados de los análisis tengan un alto nivel de confiabilidad.

Las muestras individuales (libres de tierra e insectos contaminantes) se deben colocar en bolsas con cierre hermético debidamente rotuladas y con una toalla de



papel seca para que absorba la humedad, y se deben enviar al laboratorio con servicio de entrega rápida.

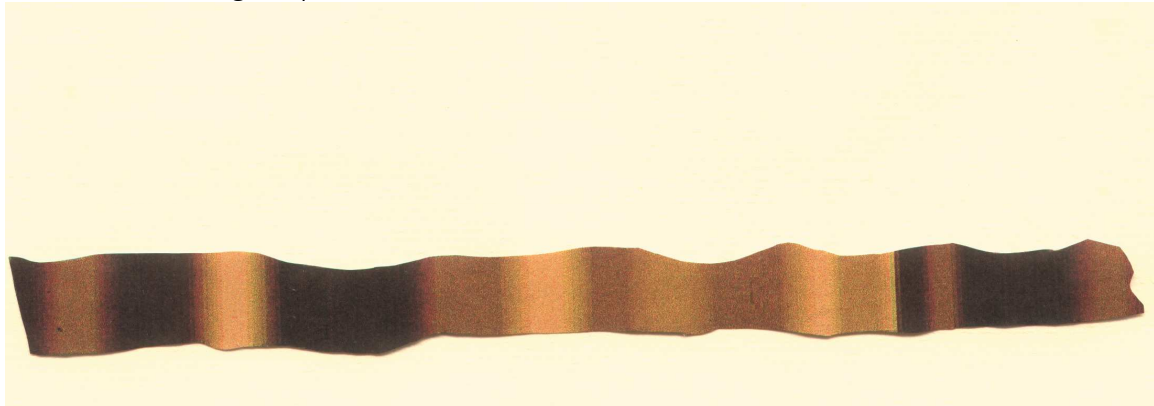


Figura 2: Distribución de GLRaV-1 en una estaca durmiente.

INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS: RESULTADOS POSITIVOS/NEGATIVOS EN EL LABORATORIO

Una pregunta muy frecuente es: ¿Cuando se es un resultado positivo un positivo verdadero y cuando es un resultado negativo un negativo verdadero? Un resultado positivo da certeza de que hay infección. Un resultado negativo indica que no se detectó el agente patógeno. Sin embargo, el resultado negativo puede darse cuando el agente patógeno que se intenta detectar se encuentra por debajo del umbral de detección del análisis. Esto puede ocurrir cuando se toma una muestra de una parte incorrecta de la planta, o cuando se toma la muestra en una época del año que no es la indicada, o cuando se incluyen múltiples vides en una misma muestra. Esto se conoce como falso negativo.

Asimismo un falso positivo se define como un resultado de laboratorio positivo cuando en realidad la vid no está infectada. Un falso positivo no debería ocurrir **nunca**, pero puede ocurrir. Para reducir al mínimo los falsos positivos, la limpieza y confiabilidad del laboratorio que realiza el análisis es indispensable. Un falso positivo puede ocurrir si el laboratorio maneja el material con las manos contaminadas o con guantes contaminados; crea contaminación cruzada con superficies, instrumentos, o contenedores; u opera en condiciones de limpieza que no son las apropiadas. Todas las pruebas deben incluir controles positivos y negativos. El control positivo demuestra que el protocolo de la prueba funciona y el control negativo indica que no hay contaminación cruzada entre muestras.

Una situación que puede llevar a un falso positivo es que la metodología utilizada para detectar el agente patógeno no sea lo suficientemente específica para ese agente patógeno, lo que hace que se detecten otras cepas o variantes del mismo agente patógeno. Sin embargo, en este caso la prueba por lo menos puede detectar la presencia de un agente patógeno—aunque no específicamente el que se buscaba. Cepas y variedades de cada agente patógeno pueden ser tan dañinas como los aislados tipo y para los propósitos de la prueba, los análisis usualmente se desarrollan para detectar un amplio rango de aislados de cada agente patógeno.⁴

Las causas de falsos negativos pueden ser variaciones estacionales en los niveles de los agentes patógenos, la distribución errática de agentes patógenos en la vid, la falta de patógenos característicos (ej. la presencia de un nuevo agente causante de enfermedad), la falta de métodos de detección de alta seguridad, o el uso impropio de controles.

Si un productor envía muestras de vides sintomáticas para análisis sin saber la casusa, el laboratorio puede hacer un análisis completo de virus y fungoideos y no encontrar evidencia de infección de agentes patógenos conocidos. Sin embargo, la vid puede estar infectada con un agente patógenos desconocido. Un falso



negativo puede ocurrir porque el agente patógeno no ha sido caracterizado, esto es no hay un método disponible para su detección.

Es de gran importancia que el cliente sepa y comprenda el proceso de recolección de muestras y que tenga confianza en el laboratorio al que le lleva las muestras. En muchos casos, someter muestras adicionales puede ayudar a determinar la causa de la enfermedad.

CONCLUSIONES

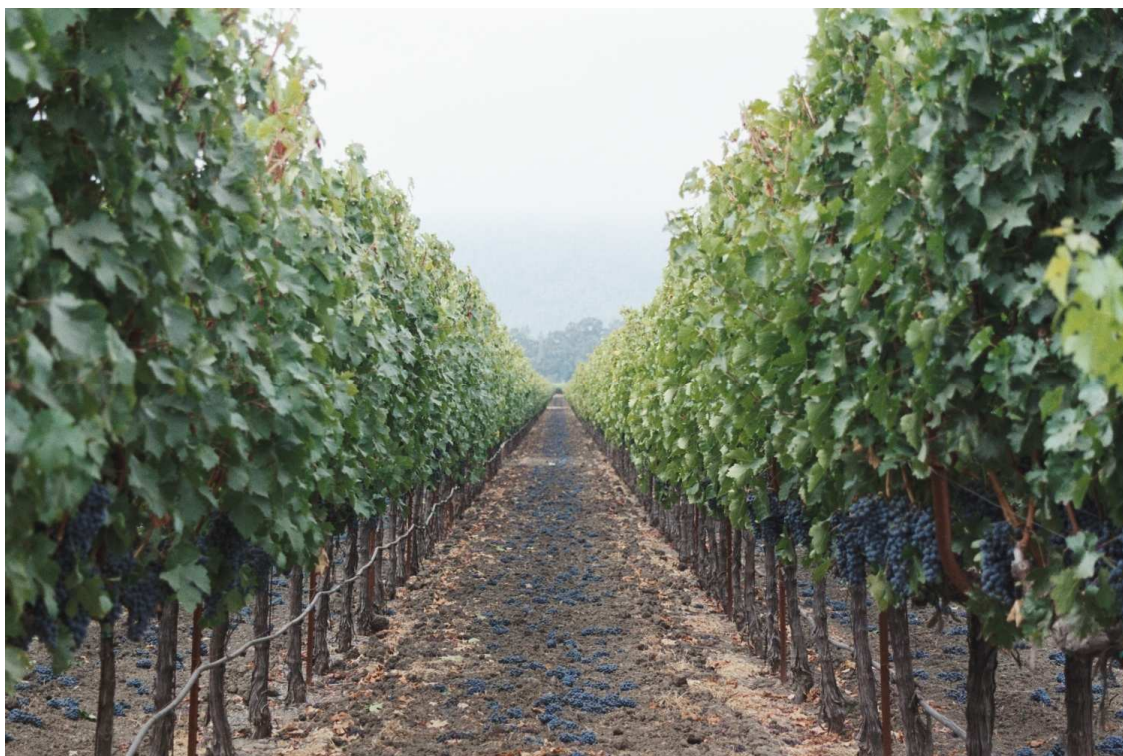
El autor espera que la respuesta a la pregunta “¿Cuándo analizar?” esté más clara. Una buena estrategia es siempre analizar las vides antes de plantar para asegurarse de que el estado de salud del nuevo viñedo sea bueno.

Aunque el análisis de un viñedo ya implantado puede resultar tardío para resolver un problema ya existente, es aconsejable realizar un análisis para detectar la causa del problema, evitar la propagación de ciertos agentes patógenos, y determinar la posibilidad de utilizar las vides para realizar futuras propagaciones u operaciones de injerto en la parte superior.

Someter a análisis tantas muestras como sea posible de acuerdo al presupuesto (más de una muestra por vid) aumentará las posibilidades de detección de virus que se encuentran distribuidos de forma poco uniforme.

Hay muchas razones para analizar las vides para la detección de agentes causantes de enfermedades. Cuando se recolectan los materiales para la propagación, se deben analizar tanto el vástago como el porta injerto madre. Es también importante la comprensión de los procedimientos de muestreo y de variabilidad estacional que son óptimos.

La confianza en los resultados de los análisis—para minimizar las posibilidades de falsos positivos y falsos negativos— se logra de mejor manera al recurrir a un laboratorio que emplea metodologías y controles meticulosos. Los productores y las personas encargadas de los viñedos deben trabajar junto a un patólogo especialista en plantas y asesores para determinar cuál es el laboratorio que mejor se adapta a sus necesidades. La decisión de realizar un análisis de laboratorio para hacer una plantación estratégica y planes financieros es un paso importante para el manejo exitoso de un viñedo.





1. Cabaleiro, C., A. Segura, J. García-Berrios.1999. "El Efecto del Virus del Enrollamiento de la Hoja 3 en la Fisiología y el Mosto de *Vitis vinifera* L. cv. Albariño Seguido de la Contaminación del Campo" ("Effect of grapevine leafroll associated virus 3 on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño following contamination in the field.") *Am. J. Enol. & Vitic.* 50: 40-44. (Europe).
2. de Borbón, C.M., O. Gracia, and G.S. Gómez Talquenca."Insectos y el Virus del Enrollamiento de la Hoja de La vid 3 en Viñedos de Mendoza, Argentina" ("Mealybugs and Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 in Vineyards of Mendoza, Argentina.") 2004. *Am. J. Enol. & Vitic.* 55:3:283-285.
3. Golino, D.A, E. Weber, S. Sim, and A. Rowhani. La Rápida Propagación del Virus del Enrollamiento de la Hoja en Napa Valley, CA. Primer Congreso Anual Nacional de Investigación en Vitivinicultura (Rapid spread of leafroll disease in Cabernet Sauvignon grapevines in Napa Valley, CA. Proceedings of the 1st Annual National Viticulture Research Conference) Julio 18-20, 2007. UC Davis.
4. Habili, N. and J. Monis. Temas Relevantes del Encuentro ICVG 2006. Avances en Investigación: Virus de la Vid. (Highlights of ICVG 2006 Meeting. Advances in Research: Grapevine viruses.) "*Practical Winery & Vineyard*" Noviembre/Diciembre 2006.
5. Habili, N., and F.W. Nutter, Jr. 1997. "Análisis Temporal y Espacial del Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Vid 3 en Vides de Pinot Noir en Australia" ("Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia.") *Plant Dis.* 81:625-628.
6. Engelbrecht, D.J., and G.G.F. Kasdorf.1985. Asociación del closterovirus con las vides que dan un resultado positivo al virus del enrollamiento de la hoja y la evidencia para su propagación natural en la vid" ("Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine.") *Phytopathologia Mediterranea* 24: 101-105. (Sudáfrica)
7. Monis, J., and R.K. Bestwick.1996. "Detección y Ubicación del Virus del Enrollamiento de la Hoja Closterovirus en Plantas de Invernadero y por Cultivo de Tejido" ("Detection and Localization of Grapevine Leafroll Associated Closteroviruses in Greenhouse and Tissue Culture Grown Plants.") *Am. J. Enol. & Vitic.* 47:2:199-205.
8. Pietersen, G. "La propagación del Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Vid en Sudáfrica: un problema difícil pero no Invencible" ("Spread of Grapevine Leafroll Disease in South Africa - a difficult, but not insurmountable problem.") <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0406leaf.php3>

Recibido: Enero 2008

Aceptado: Marzo 2008

NDLR: Si desea contactarse con la autora del trabajo comuníquese a enologia@revistaenologia.com