

# Actuaciones y herramientas usadas en vivero para reducir el impacto de las enfermedades de madera de la vid obtenidas a través de proyectos I+D+i

**Carlos L. Villanueva** (Responsable de Proyectos de I+D+i y del Departamento Técnico de Viveros Villanueva Vides S.L. Larraga, Navarra).

**Juan José R. Coque y Enrique Garzón-Jimeno** (Instituto de Investigación de la Viña y el Vino (IIVV), Universidad de León, León).

Viveros Villanueva Vides S.L. (Larraga, Navarra) es el vivero de plantas de vid líder en España y uno de los más grandes de Europa. Las enfermedades de la madera de la vid (EMV) son una de las más graves amenazas del sector vitivinícola a nivel mundial. Diferentes estudios han identificado los viveros de plantas de vid como un punto crítico donde se produce la infección del material vegetal por varios de los hongos fitopatógenos responsables de estas patologías. Consciente de esta situación y con el objetivo de dar el mejor servicio posible a sus clientes Viveros Villanueva viene desarrollando en los últimos 10 años diferentes líneas de trabajo y proyectos de I+D+i para reducir el impacto de las EMV. En esta publicación se repasan las principales líneas de trabajo de la empresa.

## Líneas de trabajo de Viveros Villanueva Vides S.L. para el control de EMV en vivero

### Periodo 2008 – 2011. Análisis interno para identificar los puntos críticos de contaminación.

Los trabajos de Viveros Villanueva para el control del proceso productivo a fin de reducir el grado de infección del material vegetal (plantas injertadas) puestas en el mercado se inician en el año 2008 y se extienden hasta 2011. En esta primera fase el objetivo era conocer el grado de presencia de hongos patógenos en las diferentes etapas del proceso productivo a fin de identificar los puntos críticos del mismo en los que el riesgo de contaminación era mayor.

Estos trabajos consistieron en la detección, cuantificación y aislamiento de hongos patógenos en las diferentes etapas del proceso productivo incluyendo:

- Análisis de los campos de plantas madre (variedades americanas y viníferas de las que se obtienen los patrones o portainjertos y las yemas) mediante la detección de hongos patógenos tanto en suelo como en material vegetal.
- Análisis de los campos de variedades (suelo y material vegetal) de donde se obtienen las variedades a injertar sobre los patrones.
- Control ambiental de la presencia de hongos patógenos en las instalaciones de producción: naves de preparación del material vegetal e injertado, naves de almacenamiento y conservación del material, cámaras de calor para la formación del callo en el injerto.
- Control de los tanques de hidratación, máquinas injertadoras y máquinas de desyemado.
- Análisis del nivel de infección de los injertos antes y después de pasar por el vivero en campo.

- Análisis del material vegetal expedido para el comprador, incluyendo el control de la turba usada en el empaquetamiento.

Este pormenorizado análisis permitió identificar varios puntos críticos donde el riesgo de infección era mayor:

- Por un lado el estudio demostró que es necesario un control preciso de los suelos donde se cultivan las plantas madre, las variedades y los injertos, ya que los niveles de hongos patógenos son proporcionales a los niveles de materia orgánica para su crecimiento.
- Los campos de plantas de madre son un punto sobre el que hay que realizar un control exhaustivo, ya que dichas plantas pasan numerosos años en el suelo donde se van contaminando lentamente.
- La etapa de injertado, en la que físicamente se utilizan máquinas injertadoras para la formación de los injertos en omega entre los patrones y las variedades es un punto en el que se pueden producir numerosas infecciones.
- Por último, el mayor riesgo de infección se identificó en la etapa de establecimiento de los injertos en el vivero en suelo, cuando éstos tienen que desarrollar un incipiente aparato radicular, a través del cual los hongos fitopatógenos pueden penetrar en la planta.

### Periodo 2012-2016. Proyectos de I+D+i y otras actuaciones para el control de EMV en viveros.

Una vez identificados los puntos críticos del proceso en los que el riesgo de infección era mayor Viveros Villanueva comenzó a desarrollar un programa de actuaciones tendentes a disminuir el riesgo de infección en cada punto en concreto. Estas actuaciones se resumen a continuación.



Figura 1. Detalle del efecto antifúngico de las cepas de actinobacterias patentadas por Viveros Villanueva, *Streptomyces* sp. VV/E1 (izquierda), *Streptomyces* sp. VV/R1 (centro) y *Streptomyces* sp. VV/R4 (derecha) en base a su capacidad para inhibir *in vitro* mediante la técnica del bioensayo el crecimiento de hongos causantes de enfermedades de madera de la vid.

- Análisis exhaustivo de todas las parcelas de suelos del vivero para el desarrollo de un programa de abonados y tratamientos específicos que permitan reducir al mínimo la población de hongos patógenos presentes en suelos. Esta labor de análisis y control se realiza con una periodicidad anual.
- En el caso de los campos de plantas madre de variedades americanas en el año 2016, Viveros Villanueva ha comenzado un proceso de control de material vegetal base (plantas de las que se obtienen los portainjertos). Este estudio consiste en analizar planta por planta por qPCR (o PCR cuantitativa) la presencia de los principales hongos patógenos causantes de EMV. Ello permite la identificación de plantas infectadas y su reposición por material vegetal sano.
- A fin de desarrollar tecnologías para el control de las EMV en la fase de injertado y para evitar la infección de los injertos durante el establecimiento del vivero en suelo Viveros Villanueva ha desarrollado el proyecto "Aislamiento y caracterización de agentes de biocontrol específicos para combatir la infección de plantas de vid en vivero por el hongo fitopatógeno *Cylindrocarpon* sp., diseño de estrategias de control de hongos de madera en puntos críticos del proceso e influencia de la fertilidad del suelo en la supervivencia de hongos patógenos".

Este proyecto, desarrollado entre mayo de 2012 y abril de 2015, ha sido financiado por CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) y la Comunidad Foral de Navarra y desde el punto de vista técnico ejecutado por personal del Instituto de Investigación de la Viña y el Vino (IIVV) de la Universidad de León. Entre los logros más significativos de este proyecto citaremos:

- El empleo de soluciones de antifúngicos naturales, fundamentalmente aceites esenciales, que aplicadas en la fase de injertado reducen y controlan la proliferación de hongos patógenos y disminuyen el riesgo de infección del injerto. De hecho los antifúngicos naturales pueden ser una herramienta eficaz y alternativa a los pesticidas de síntesis química para el control de EMV (Cobos y col., 2015).
- El desarrollo de agentes de control biológico (ACB) basados en el empleo

de cepas de actinobacterias del género *Streptomyces* para el control de hongos patógenos capaces de infectar los injertos a través del aparato radicular durante el establecimiento del vivero en suelo. Las actinobacterias son bacterias Gram(+) de tipo filamentosas, muy abundantes en suelo y que tienen una gran capacidad de producción de metabolitos secundarios, incluyendo compuestos antifúngicos capaces de inhibir el desarrollo de hongos patógenos causantes de EMV. El estudio se inició con un análisis pormenorizado de las poblaciones de actinobacterias presentes en el interior de plantas de vid (injertos de 6 meses) desarrolladas en vivero (cepas endofíticas) y en el entorno del aparato radicular (cepas rizosféricas). Este estudio permitió el aislamiento de numerosas cepas endofíticas y rizosféricas de actinobacterias. Posteriormente se realizó un rastreo individual por bioensayo (Figura 1) de cada cepa para determinar su capacidad de producción de compuestos antifúngicos, capaces de inhibir el crecimiento de los hongos patógenos *Diplodiaseriata*, *Dactilonectria macrodidyma* (antiguamente denominado *Cylindrocarpon macrodidymum*), *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum* (antiguamente denominado *P. aleophilum*). Estos 3 últimos patógenos son detectados muy frecuentemente en suelos de viñedo y son capaces de infectar las plantas a través del aparato radicular, no existiendo hasta la fecha ningún método efectivo para controlar la infección del aparato radicular. Este rastreo permitió identificar un total de 10 cepas de actinobacterias (5 endofíticas y 5 rizosféricas) que por su capacidad para inhibir el crecimiento de todos o parte de estos patógenos fueron seleccionadas para la realización de estudios en campo. El estudio consistió en su aplicación a injertos por inmersión en una suspensión de actinobacterias (Figura 2A), de forma que estas puedan colonizar el injerto. Los injertos se establecen en suelo en un vivero experimental (Figura 2B) y se permite que completen su ciclo vegetativo, momento es que se procede a un análisis del número de hongos patógenos presentes en el material vegetal. Este estudio permitió la identificación de una cepa endofítica y dos cepas rizosféricas que aplicadas a los injertos tenían la capacidad de disminuir ligeramente el nivel de mortalidad frente a plantas control no tratadas (Figura 3) y disminuir de forma significativa los niveles de los



Figura 2. (A) Aplicación de las actinobacterias seleccionadas a injertos de vid por inmersión de injertos en una suspensión acuosa conteniendo los agentes de control biológico (izquierda) y (B) detalle del establecimiento del vivero experimental (años 2013, 2014 y 2015) en tierra de los injertos tratados con actinobacterias (derecha).

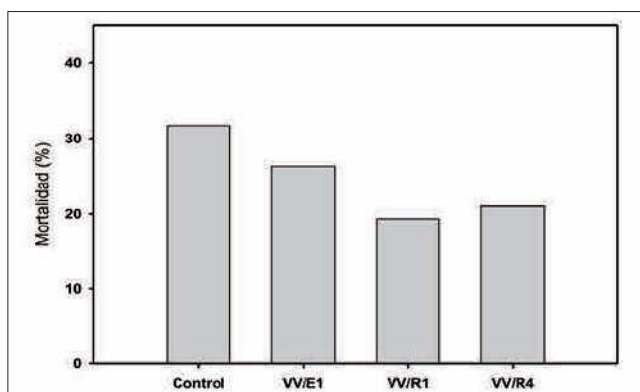


Figura 3. Disminución del nivel de mortalidad observado en injertos de vid tratados con las actinobacterias *Streptomyces* sp. VV/E1, *Streptomyces* sp. VV/R1 y *Streptomyces* sp. VV/R4 por comparación con el nivel de mortalidad observado en plantas control no tratadas con actinobacterias.

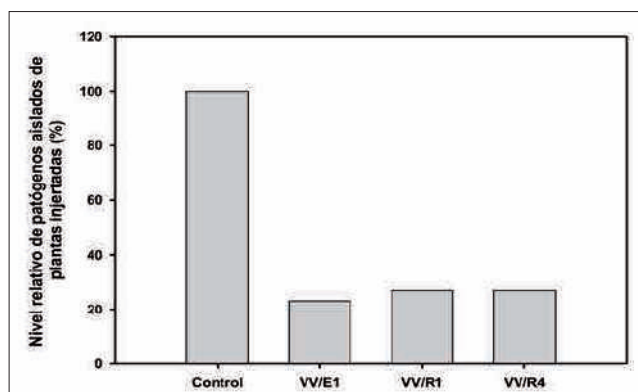


Figura 4. Descenso relativo del grado de infección por los hongos patógenos *Ilyonectria* sp., *Dactylonectria* sp., *P. chlamydospora* y *P. minimum* observado en injertos de vid tratados con las actinobacterias *Streptomyces* sp. VV/E1, *Streptomyces* sp. VV/R1 y *Streptomyces* sp. VV/R4 por comparación con el nivel de infección detectado en plantas control sin tratar.

hongos patógenos analizados (Figura 4). Dado el interés aplicado de estas cepas como potenciales ACB han sido patentadas en España por Viveros Villanueva (Álvarez-Pérez y col., 2016a) y se ha presentado solicitud de patente europea (Álvarez-Pérez y col., 2016b).

### Periodo 2015-2016. Colaboración con el ICVV.

Viveros Villanueva colabora con David Gramaje del ICVV de La Rioja en un proyecto para el análisis y estudio de los puntos críticos en el proceso de producción de plantas de vid. Se analizaron cada uno de los procesos obteniendo las siguientes conclusiones:

- De los 6 procesos analizados, se encuentran riesgo de contaminación en dos de ellos.
- Proceso de injertado y periodo de establecimiento en campo son los puntos

de riesgo de contaminación. Siendo el tiempo en campo el de mayor riesgo.

- Estas conclusiones ratifican los estudios anteriores realizados por Viveros Villanueva y coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación.

### Periodo 2016-2020. Proyectos de futuro y otras actuaciones rutinarias.

Viveros Villanueva es consciente de que el control de las EMV en vivero es una lucha compleja y larga y que los buenos resultados solo se obtienen con una atención constante a este problema. Es por ello que la empresa ha establecido para los próximos años una serie de objetivos que se resumen a continuación.

Por un lado la introducción sistemática durante el proceso productivo de una serie de herramientas que permitan minimizar el impacto de las EMV y el riesgo de infección. Entre ella citaremos como más importantes: 1) Actuaciones anuales sobre el suelo de cultivo con programas de abonados específicos para reducir al mínimo la población de hongos patógenos. 2) Caracterización completa de

los suelos en los que se establecen los viveros para determinar las zonas más idóneas para cada patrón o portainjertos. El objetivo es reducir posibles estreses en la planta que las predispongan a la infección, minorando dicho riesgo. 3) Tratamiento de las heridas de poda y de las heridas que producen las máquinas injertadoras con antifúngicos naturales, a fin de minimizar o evitar la infección de heridas de poda por hongos patógenos. 4) Aplicación de las actinobacterias seleccionadas por Viveros Villanueva como agentes de biocontrol a suelos e injertos para reducir el riesgo de infección. 5) Mejoras en las instalaciones y maquinarias utilizadas en el proceso productivo, extremando además las medidas de limpieza e higiene. Para ello se ha establecido una colaboración con Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV) de La Rioja, para el análisis de la presencia de hongos patógenos en instalaciones y material vegetal. 6) El empleo de micorrizas y hongos del género *Trichoderma* como un refuerzo y protección especial para el aparato radicular (productos de la casa ATENS).

Por otro lado, Viveros Villanueva ha comenzado a desarrollar (agosto de 2016 a julio de 2020) en colaboración con el IIVV de la Universidad de León el subproyecto de investigación titulado "Efecto protector de actinobacterias seleccionadas para evitar la infección por hongos de madera de plantas jóvenes de vid a través del aparato radicular: estudios en viñedos de nueva plantación". Dicho proyecto se encuadra dentro del proyecto GLOBALVITI que está siendo financiado por el CDTI (convocatoria CIEN), en el que participan numerosas empresas del sector vitivinícola y centros afines. El objetivo de este nuevo trabajo

es analizar el posible efecto protector de las actinobacterias patentadas por Viveros Villanueva en viñedos de nueva plantación, a fin de reducir la infección por hongos a través del aparato radicular y de esa forma contribuir a reducir los niveles de decaimiento de viñedos jóvenes.

## Conclusiones

Como conclusiones más significativas podemos exponer:

- 1) Viveros Villanueva en la actualidad desarrolla y aplica un protocolo integral de medidas tendentes a reducir la contaminación por hongos causantes de EMV en viveros.
- 2) Dicho protocolo incluye medidas de mejora de instalaciones y maquinaria, control de suelos y aplicación de antifúngicos naturales a heridas de poda e injertado para reducir el riesgo de infección, además del empleo de micorrizas y hongos del género *Trichoderma* como refuerzo y protección del aparato radicular.
- 3) Viveros Villanueva ha sido pionera a nivel mundial en el desarrollo de agentes de biocontrol basados en el empleo de actinobacterias rizosféricas y endofíticas del género *Streptomyces* para reducir el riesgo de infección de injertos establecidos en suelo a través del aparato radicular. Dicha tecnología ha sido patentada por Viveros Villanueva.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cobos, R., Mateos, R.M., Álvarez- Pérez, J.M., Olego, M.A., Sevillano, S., González-García, S., Garzón, E. y Coque, J.J.R. 2015. Effectiveness of natural antifungal compounds to control infection through pruning wounds by grapevine trunk disease pathogens. *Appl. Environ Microbiol.*, 81: 6474-6483.
- Álvarez-Pérez, J.M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M.A., Garzón-Jimeno, E y Coque, J.J.R. 2016a. Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid y procedimiento para su aplicación en injertos de vid. Patente Española ES2543363.
- Álvarez-Pérez, J.M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M.A., Garzón-Jimeno, E y Coque, J.J.R. 2016b. Product for controlling phytopathogenic fungi that cause grapevine Wood diseases and method for the application thereof in grapevine grafts. European Patent Application number 362166.