

Diagnóstico integral de enfermedades de viña: desde la técnica ELISA a la metagenómica

Ana Crespo Sempere, Alejandro Carralero González, Montserrat Plomer Sáez, Magdalena Cervera Ocaña y María R. Albiach Martí (ValGenetics SL, Parc Científic de la Universitat de València, Paterna, Valencia).

La importancia del cultivo de la vid en España es evidente, tanto para la producción de uva de mesa como para la destinada a la transformación y elaboración de vinos y mostos. Muchos son los factores que tienen influencia en la calidad del producto final, pero el correcto estado sanitario de las cepas es fundamental para conseguir una buena producción. Es por ello que el diagnóstico precoz del material infectado resulta imprescindible para evitar la dispersión de enfermedades y conseguir producciones de calidad.

Según el Real Decreto 208/2003, de 21 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid, el material de multiplicación así como las cepas madre deberán estar libres de las bacterias *Xylophilus ampelinus* y *Agrobacterium* spp.

Además, se ha de asegurar la ausencia del virus del entrenado corto infeccioso de la vid (GFLV), el virus del mosaico del Arabis (ArMV), el virus del enrollado de la viña I y III (GLRVI y GLRVIII) y el virus del jaspeado de la vid (GFVK) (sólo para los patrones). ValGenetics SL está comprometida con la sanidad del material vegetal y ofrece servicios integrados de diagnóstico de las enfermedades de viña y de saneamiento por micropropagación in vitro (Figura 1). Desde los inicios de la empresa una buena parte de sus esfuerzos y recursos de I+D+i se han destinado al diagnóstico de virus, bacterias, fitoplasmas y hongos de la vid.

Para la detección de las enfermedades víricas se utilizan dos metodologías fundamentalmente, la técnica inmunológica ELISA y la técnica de amplificación de ADN o PCR. El ensayo ELISA, cuyas siglas en inglés provienen de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, se basa en el uso de anticuerpos que reaccionan con el patógeno en una placa observándose un cambio de color cuando la muestra es positiva (Figura 2). Dado que esta metodología está basada en el uso de anticuerpos, presenta la ventaja de que permite detectar también razas virales que contengan alguna mutación en su genoma. Sin embargo, presenta como principal desventaja que generalmente sólo detecta niveles altos de patógeno, por lo que,



Figura 1. Análisis de muestras de viña para la detección de patógenos en las instalaciones de ValGenetics. Los laboratorios de ValGenetics SL cuentan con la autorización del organismo de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana para realizar análisis de diagnóstico fitopatológico de patógenos de cuarentena.

en ocasiones, si la muestra tiene una concentración viral reducida no resulta detectable mediante ELISA. La técnica de PCR, del inglés "Polymerase Chain Reaction", consiste en la amplificación y detección del ADN o ARN del patógeno (Figura 2). Se trata de una técnica muy sensible, que permite detectar niveles muy bajos de patógeno. En los laboratorios de ValGenetics hemos implantado las dos metodologías (ELISA y PCR), ya que en ciertas ocasiones pueden ser técnicas complementarias para la detección de las enfermedades víricas en viña.

Por otra parte, en el diagnóstico de los virus de viña, el elemento clave es el nivel de infección de la planta. La concentración del virus, y por tanto

la sintomatología, varía a lo largo del año. En el período de latencia, época en la que viveristas cortan las estacas para su propagación, es prácticamente imposible su diagnóstico. Asimismo, la concentración del virus también dependerá del tejido vegetal muestreado. De esta forma, las plantas en ocasiones no presentan sintomatología vírica a pesar de estar infectadas, ya sea porque la planta se halla en fase de inicio de infección y los virus están en muy baja concentración, o porque se han desarrollado en una variedad que es tolerante a la enfermedad. Estas consideraciones son de gran relevancia, ya que en determinadas condiciones el material de multiplicación puede parecer asintomático pero al variar

las condiciones meteorológicas o injertarse en una planta susceptible se pueden desarrollar enfermedades severas en la viña. En líneas generales, los virus GFLV y el ArMV se detectan más fácilmente en hojas de brotes jóvenes en primavera aunque también se podría detectar por PCR en raspados del floema de tallos maduros en otoño e invierno (Weber y col., 2002). Para los virus GLRVI y GLRVIII es preferible muestrear en hojas maduras al final de verano o en menor medida en raspados del floema de tallos maduros en otoño e invierno. Por último, el GFkV se detecta con mayor facilidad en brotes y hoja joven en primavera, aunque también se podría detectar por PCR en el floema de tallos maduros en otoño o invierno.

En lo que respecta a las infecciones de origen bacteriano, el patógeno emergente *Xylophilus ampelinus* y la tuberculosis producida por *Agrobacterium* spp. generan las enfermedades bacterianas más importantes en vid. Para su diagnóstico, ValGenetics ha implantado una PCR con una etapa de enriquecimiento previo que permite detectar rápidamente la presencia de estos patógenos. En el caso de *Agrobacterium* spp., se pueden detectar los biovars 1 y 2, además de *Agrobacterium vitis* (biovar 3) y *Agrobacterium rubi*, mediante una PCR multiplex de alta sensibilidad. El enriquecimiento consiste en incubar la muestra en un medio de cultivo que favorezca el crecimiento de la bacteria patógena, aumentando así la probabilidad de detectarla. De esta manera, se consigue reducir el límite de detección e incrementar sustancialmente la sensibilidad y la reproducibilidad de la técnica.

Para ciertos patógenos no es posible hacer un enriquecimiento previo, ya que no se pueden cultivar fuera de su planta hospedadora. Es el caso de los fitoplasmas de vid, considerados como uno de los patógenos emergentes más problemáticos y de difícil control en la actualidad. Las enfermedades provocadas por los fitoplasmas, que ya han sido detectadas en España en los últimos años, son la flavescencia dorada y la madera negra (Bois Noir) (Battle y col., 2000; Sabaté y col., 2014). Estas enfermedades causan un debilitamiento progresivo y muerte final de la planta. Con el fin de ayudar al control y detección de fitoplasmas, ValGenetics ha establecido una metodología de diagnóstico más específica, basada en PCR cuantitativa (Figura 2), con un tiempo de entrega de resultados de 24-48 hr.

Otras de las patologías más dañinas que afectan al cultivo de la vid son las producidas por enfermedades de hongos de madera en vid (Agustí-Brisach y col., 2013). Éstas comprenden la enfermedad de Petri (asociada a especies del género *Phaeoacremonium*,

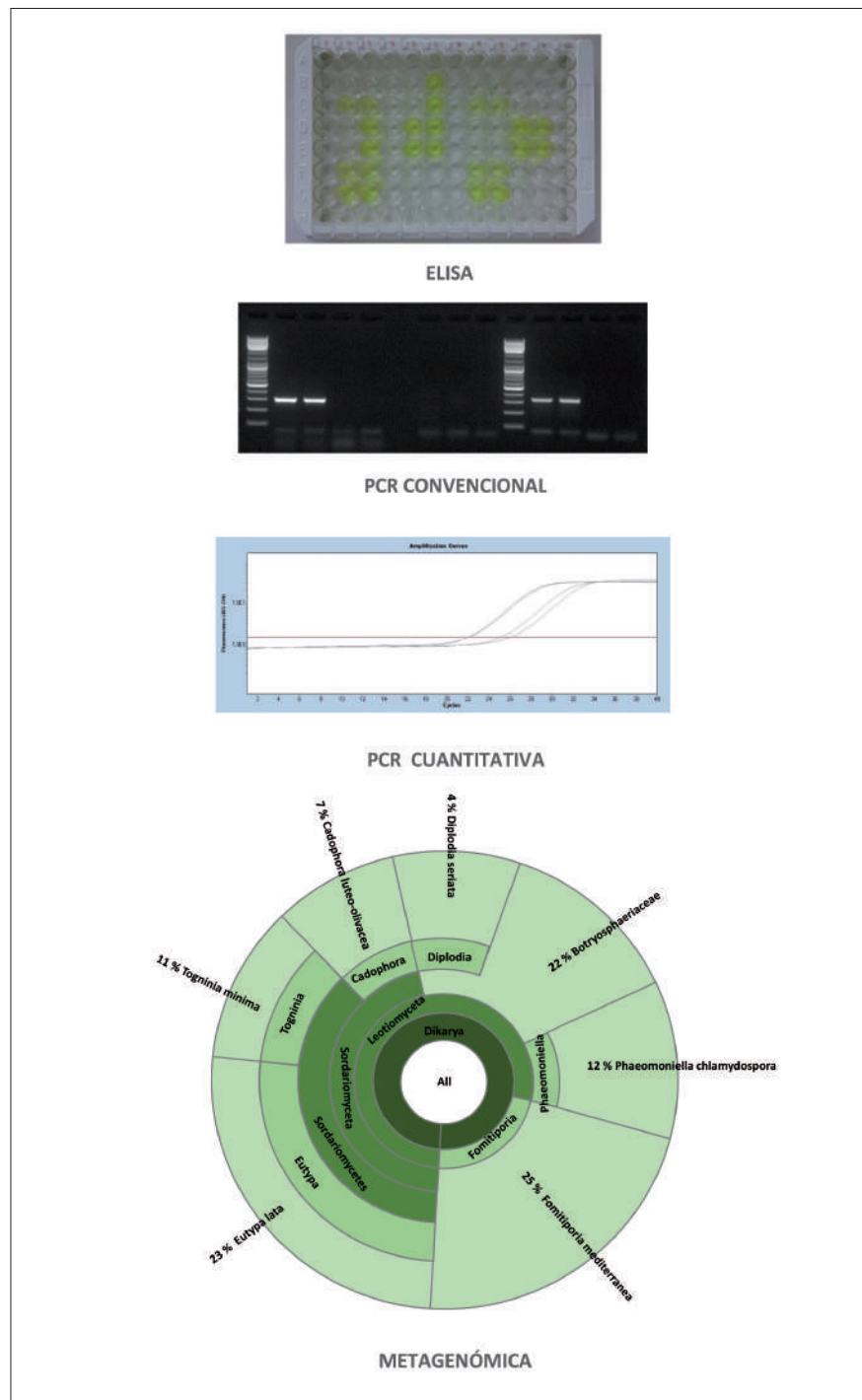


Figura 2. Las técnicas de diagnóstico empleadas en ValGenetics para la detección de patógenos de viña son variadas, dependiendo del agente causal y de la sensibilidad requerida.

Phaeoconiella chlamydospora y *Cadophora luteo-olivacea*), la enfermedad del pie negro (producida por especies de los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria*) y el brazo negro muerto (relacionada con especies de *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Spen-cermartinsia*). Como se puede observar, el número de

especies fúngicas asociadas a estas enfermedades es muy elevado. Es por ello que la detección de cada uno de estos patógenos de forma individual, ya sea por ELISA o PCR, es poco práctica y eficiente, además de encarecer el análisis de la muestra. ValGenetics, como empresa puntera en biotecnología, ha desarrollado una metodología de detección basada en el análisis

metagenómico. Con esta técnica no sólo se puede detectar la presencia de estas distintas especies de hongos en una única analítica sino que, además, los resultados obtenidos nos proporcionan la abundancia relativa de cada una de las especies de hongos patógenos en la muestra (Figura 2). La técnica del análisis metagenómico consiste en una extracción del material genético contenido en la muestra vegetal infectada, seguido de una única amplificación específica por PCR del material genético fúngico y posterior secuenciación masiva del ADN fúngico amplificado. Esta técnica posee una sensibilidad muy elevada y aporta un diagnóstico absoluto. El diagnóstico por metagenómica se puede realizar en aproximadamente una semana. Es por ello que desde ValGenetics apostamos por esta técnica para la detección de enfermedades fúngicas, lo que puede ser de indudable utilidad para el sector vitivinícola.

Una de las estrategias para la eliminación de patógenos en campo y el incremento de la producción en vid es la aplicación de programas de plantación de plantas libres de patógenos. El saneamiento o curación de plantas, mediante cultivo *in vitro* de meristemos apicales, quimioterapia y/o termoterapia (Barlass y col., 1982), es uno de los



Figura 3. Detalle de la micropropagación *in vitro* de una variedad de vid en las instalaciones de ValGenetics.

pilares de estos programas, el cual es esencial en el rescate de variedades tradicionales o endémicas de vid (Figura 3).

ValGenetics apuesta por una viticultura de vanguardia con alto valor añadido basada en el diag-

nóstico precoz y la utilización de planta sana libre de virus, bacterias, hongos y fitoplasmas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., Armengol, J., and García-Jiménez, J. (2013) Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control. *Tierras*, 202:108-113.
- Barlass, M., Skene, K.G.M., Woodham, R.C., Krake, L.R. (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Annals of Applied Biology* 101:291-295.
- Batlle, A., Martínez, M.A., Laviña, A. (2000) Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 106:811-816.
- Peñalver, R., López, M. M., Vicedo, B., Piquer Aguilar, J. (1994) Tumores en cuello y raíces de frutales causados por "*Agrobacterium tumefaciens*": epidemiología y control. *Viticultura enología profesional*, ISSN 1131-5679, 35: 11-33.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle A. (2014) Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors. *European Journal of Plant Pathology* 139:185-193.
- Weber, E., Golino, D., Rowhani, A. (2002) Laboratory testing for grapevine diseases. *Practical Winery and Vineyard Journal*.