

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

IV Congreso Agroalimentario de Extremadura

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA ALMENDRALEJO



Del 3 al 6 de Mayo 2022

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
IV CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

© ALBERTO CATILLO

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-112-0

D.L.:

Imprime: Impresal

Selección de clones libres de virus de las principales variedades autóctonas de vid en Extremadura

CINTAS LEAL, R.

URIARTE HERNÁNDEZ, D.

MANCHA RAMÍREZ, L.A.

MARTÍN GUTIÉRREZ, R.

GIRALDO RAMOS, E.

Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX),
Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera, Crta. A-V, Km 372.
06187 Guadajira, Badajoz, España.

RESUMEN

España es líder mundial en superficie de viñedo (953ml ha), y tercera en producción de uva. A nivel nacional, Extremadura es la segunda comunidad autónoma en superficie de viñedo (8,5%), y produce 3,6 millones de hectólitros anuales de vino. Disponer de material vegetal de calidad de *Vitis vinífera* L., libre de enfermedades y adaptado a las necesidades actuales del mercado en el marco del cambio climático, resulta de gran importancia, ya que de ellas depende la producción y calidad de la uva y los vinos. Con el objetivo de ampliar el número de clones certificados de las variedades Pardina, Cayetana, Eva, Montúa y Morisca de la Selección Clonal y Sanitaria del CICYTEX, este trabajo evalúa mediante la técnica RT-PCR, la presencia de los

virus del jaspeado (GFKV), entrenudo corto (GFLV) y enrollado 3 (GLRaV-3). Para ello se llevó a cabo una prospección de 280 cepas preseleccionadas por su actitud vitivinícola y distribuidas entre 42 parcelas comerciales de distintas zonas productivas de la región. Los análisis se realizaron sobre madera de poda (invierno). Los resultados mediante RT-PCR muestran 146 cepas libres de estos virus, siendo un 51,78% del total prospectado. En cuanto a la incidencia en el material analizado, se observó que el virus más frecuente fue GFKV con un 31,1%, seguido de GFLV y de GLRaV-3 con un 17,5% y 13,35% respectivamente. Entre variedades, Pardina mostró la mayor presencia de estos virus, destacando GFKV con un 47,6% de incidencia en las cepas analizadas. En el lado opuesto, Montúa con un 25,0% de cepas infectadas, ha resultado ser la variedad con menor incidencia. Se precisa continuar la línea de este estudio, para obtener mayor cantidad de clones sanos, en especial de Pardina y Eva, ampliando las zonas prospectadas.

Palabras Clave: RT-PCR, jaspeado, entrenudo corto, enrollado, vid.

ABSTRACT

Spain is the world leader in vineyard area (953ml ha), and third in grape production. At a national level, Extremadura is the second winegrowing area (8.5%) and produces 3.6 million hectoliters of wine per year. The availability of quality plant material of *Vitis vinifera* L., free of diseases and adapted to current market needs in the context of climate change, is of great importance, as the production and quality of grapes and wines depend on them. To increase the number of certified clones of the varieties Pardina, Cayetana, Eva, Montúa, and Morisca of the CICYTEX Clonal and Sanitary Selection, this work evaluates the presence of the Grapevine Fleck virus (GFKV), Grape Fan Leaf virus (GFLV) Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) using the RT-PCR technique. For this purpose, 280 vines preselected for their vitivinicultural attitude and distributed among 42 commercial plots of different productive areas of the region were tested. The analyzes were carried out on pruned wood (winter) and leaves (spring). The RT-PCR results show 146 plants free of these viruses, 51.78% of the total number of plants tested. Regarding the incidence in the analyzed material, it was observed that the most frequent virus was GFKV with 31.1%, followed by GFLV and GLRaV-3 with 17.5% and 13.35% respectively. showed the highest presence of these viruses, with GFKV standing out with

47.6% of incidence in the vines analyzed. On the other hand, Montúa, with 25.0% of the infected vine, was the variety with the lowest incidence. It is necessary to continue with this study to obtain a greater number of healthy clones, especially Pardina and Eva, extending the areas surveyed.

Key words: RT-PCR, fleck, fanleaf, leafroll, grapevine.

INTRODUCCIÓN

España se encuentra en la cúspide de los países con mayor superficie de viñedo a nivel mundial y tercero en cuanto a producción de uva. A nivel nacional, Extremadura es la segunda comunidad autónoma, por detrás de Castilla la Mancha, contando con una producción de 3,6 millones de hectolitros anuales. Las políticas de reconversión y restructuración de los viñedos extremeños y en especial la renovación varietal dirigida hacia variedades más aceptadas en los mercados, no hace más que acentuar la pérdida de material vegetal de la vid resiliente a las exigencias meteorológicas en un marco de cambio climático. Debido a esto, el número de variedades cultivadas de *V. vinífera* continúa reduciéndose en las zonas de Montánchez y Cañamero, en la provincia de Cáceres, donde se cultivan mayoritariamente las variedades autóctonas Borba y Alarije. En el caso de Badajoz, la mayor superficie de viñedo se concentra en la comarca de Tierra de Barros y en las Vegas Altas del Guadiana donde se cultivan tradicionalmente las variedades Pardina y Cayetana (González, M.D., 2010).

Para salvaguardar la variabilidad genética de las variedades autóctonas con buena producción y adaptación al clima de la región, el CICYTEX creó en 1988 la primera Selección Clonal de la Vid de Extremadura. Esta selección clonal cuenta hoy en día con 16 clones de 7 variedades distintas. De esta manera se está creando un reservorio de material vegetal sano, adaptado a las condiciones de cultivo de la región y con características diferenciadas, a disposición de los viticultores. Con el fin de ampliar la oferta de clones de estas variedades, en la actualidad se han realizado nuevas prospecciones de material vegetal, el cual, según el Reglamento técnico de Control y certificación de Plantas de Vivero de Vid (Real Decreto 208/2003 y Orden APA/2474/2006), debe estar exento de organismo nocivos entre los cuales se encuentran el virus del Jaspeado (GFKV), el virus del entrenudo

corto (GFLV), los virus del enrollado de la hoja 1 y 3 (GLRaV-1 y GLRaV-3) y el virus del mosaico del Arabis (ArMV). La sintomatología que presenta GFKV en las cepas produce una depresión vegetativa, disminución del tamaño de los racimos, de las bayas y reducción del contenido de azúcares (Salazar y col., 2004b). Debido a estas malformaciones puede ocasionar una pérdida en la calidad de la uva o el vino (Martelli, 2014). El GFLV se trata de un Nepovirus. Constituye el mayor problema vírico en todas las zonas vitícolas del mundo (Arias y col., 1997). Produce un corrimiento en el racimo pudiendo ser total o parcial generando una disminución en el rendimiento de hasta un 80% (Martelli 2014 y Salazar y col., 2004a). Por último, tenemos el grupo de los GLRVs (género Ampelovirus) asociados a la enfermedad de enrollado de la hoja. Actualmente, se encuentran descritas 9 tipos serológicos que van desde GLRaV-1 al GLRaV-9 (Gugerli, 2003). En este estudio se va a analizar el GLRaV-3 tratándose de uno de los más problemáticos. Las cepas que tienen este virus suelen presentar un tamaño más reducido a parte de un retraso en la maduración del fruto (Pearson y Goheen, 1996). Este problema después se ve reflejado en el rendimiento y la calidad del fruto (Martelli, 2014), en especial el tipo 3 (Charles y col., 2006 y Naidu, 2017). Para la detección de los virus, se realizó un análisis mediante la técnica RT-PCR, técnica innovadora ya que tiene un alto grado de especificidad y sensibilidad al tratarse de secuencias muy específicas del ARN viral.

Por tanto, los objetivos planteados en este trabajo son: (i). Evaluación sanitaria del material vegetal y (ii) Una primera aproximación sobre la incidencia de los virus GFKV, GFLV y GLRaV-3 en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la cepa, la distribución de los virus analizados depende del estado fenológico de la vid, ya que unos virus son detectados en mayor concentración en órganos verdes en crecimiento, mientras que otros resultan más fácilmente detectables en órganos agostados como la madera de invierno. Este hecho, ha supuesto la recogida de material vegetal de las mismas cepas tanto en hojas jóvenes de primavera (mayo-junio) como en madera de invierno (diciembre-enero) sin embargo en este trabajo se presentan únicamente los resultados obtenidos de la madera de poda.

Material de estudio

Sobre viñedos seleccionadas de diferentes zonas geográficas de la región y de las variedades a estudiar, plantados con anterioridad al año 2000, se prospectaron un total de 280 cepas con aparente buen estado sanitario, vigor y productividad, distribuidas en 42 parcelas de 12 localidades distintas de Tierra de Barros. Las cepas fueron marcadas, etiquetadas y georreferenciadas para facilitar su seguimiento en el tiempo. De estas 280 cepas, 107 corresponden a la variedad Pardina, 81 Cayetana, 25 Montúa, 45 Eva y 17 Morisca.

En este estudio se cogió madera de poda en el mes de diciembre. Se cortaron entre 5 y 10 sarmientos por capa que fueron cortados en estaquillas de unos 20 cm. Se marcaban con su código de identificación y se llevaban al laboratorio para su procesado.

METODOLOGÍA

Extracción de ARN con Nitrógeno Líquido

Las muestras marcadas se congelan con N₂ líquido para poder trabajar con posterioridad en el laboratorio. En cuanto a la extracción, se realiza un pulverizado de la muestra en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Una vez obtenido este pulverizado se procede a hacer la extracción del ARN utilizando el kit NucleoSpin RNA Plant and Fungi de Macherey-Nagel. Finalmente, eluimos la muestra en 50 µl las cuales se cuantificaron con el espectrofotómetro (Thermo Scientific- Nanodrop 1000). Análisis previos realizados en el laboratorio han demostrado que debemos tener una concentración mínima de 100 ng/µl y un ratio de 260 nm /280 nm el ratio de pureza de ARN. Estas proporciones se utilizan para evaluar la cantidad de contaminación proteica que queda del proceso de aislamiento del ARN ya que las proteínas absorben a 280 nm. Este valor de pureza debe de ser de mínimo 1.6 siendo lo más óptimo en torno a 2.

Análisis molecular mediante la técnica RT-PCR (reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction)

La detección de los virus de la vid del Jaspeado (GFKV), Entrenado Corto Infeccioso (GFLV) y Enrollado de la hoja tipo 3 (GLRaV-3) fue determinada mediante la técnica molecular RT-PCR siendo una de las mejores técnicas

del momento debido a su especificidad y sensibilidad. El diseño de los primers y las sondas utilizadas para esta técnica fueron tomados de los estudios realizados por Bertolini y Col. (2010) para el virus de GFKV mientras que para los virus de GFLV y GLRaV-3 se tomaron de Osman y Rowhani (2006). Sin embargo, realizamos unas modificaciones sobre dichos protocolos donde se utilizaron sondas Taqman. Esta sonda lleva el fluoróforo "Fam" en el extremo 5' y una molécula oscura "BHQ-1" en el extremo 3' (tabla 1.). Las muestras se analizaron por duplicado utilizando el kit qPCR-BIO Probe 1-Step Virus Detect Separate-Rox de la marca PCRBIO SYSTEMS. En cuanto a la reacción, el volumen final de las reacciones es un mix de 12 µl formado por una Master mix qPCRBio Probe 1-step Virus detected, la enzima UltraScript RTase (1X), los primers, tanto el forward como el reverse, con una concentración de 625 nM para GFKV, 400 nM para GFLV y 800 nM para GLRaV-3. En el caso de las sondas Taqman, se añadieron con una concentración de 150 nM excepto para GLRaV-3 que sería 130 nM. Finalmente se pone 300 ng de ARN molde. El programa de la RT-PCR consta de un paso de 45°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. El termociclador que se utilizó es el Step one plus real time PCR Biosystem de Applied Biosystem. La adquisición de análisis de datos se realizó con el software StepOne Plus 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras los análisis por RT-PCR realizado en madera de poda de las 280 muestras prospectadas, el 51,78% no presentaron incidencia para estos virus siendo un total de 146 cepas. GFKV, con una incidencia del 31,01%, ha sido el virus que más incidencia ha dado en toda la región (Figura 1). Estos resultados se refuerzan con los obtenidos por Fresno y col. (1997) donde realizó un primer estudio en la zona de Tierra de Barros dando un alto porcentaje de incidencia de GFKV. Además, estudios realizados por Hernández, C. A., y Cano, J. A. R. (2008) y Bertolini y col. (2011), en las zonas de la sierra de Salamanca y viñedos de la D.O de Vinapoló (Alicante), presentaron una incidencia menor siendo del 15,29% y 29,47% respectivamente. En cambio, López-Fabuel y col. (2013) dio una incidencia del 84,17% en viñedos de D.O de Alicante. Sin embargo, Bertolini también realizó un análisis en hoja joven donde la incidencia fue superior a la obtenida en madera siendo un 48,42% viéndose demostrada la heterogenicidad que presentan estos virus

según el órgano en el que se realiza su estudio. Atendiendo a la variedad, Pardina es la más afectada con un 48%, seguida de Eva y Cayetana con un 27% y 24% respectivamente mientras que Montúa es la que menos con un 12% (Figura 2).

En cuanto a la incidencia de GFLV, los resultados de RT-PCR muestran una incidencia del 17,5% (Figura 1), siendo superior a los datos obtenidos por Hernández, C. A., y Cano, J. A. R. (2008) en la sierra de Salamanca con una incidencia del 3,53%, Fresno (1992) en Castilla la Mancha y García (1991) en Castilla y León siendo ambos con una incidencia del 12%. Estos datos se relacionan también a los obtenidos por Bertolini y col. (2011) donde tanto en madera como en hoja obtuvo incidencias de 12,6% y 10,52% respectivamente, encontrándose mayor incidencia en la madera. En cambio, nuestros datos fueron muy inferiores a los obtenidos en los viñedos de D.O de Alicante teniendo una incidencia del 40,5% (López-Fabuel y col., 2013).

En cuanto a las variedades, nuevamente Pardina es la variedad más afectada con un 25% y Montúa la que menor incidencia presenta con un 4% (Figura 3).

El Virus GLRaV-3 ha sido el que menor incidencia ha presentado con un 13,35% (Figura 1). Solamente los resultados obtenidos por Hernández, C. A., y Cano, J. A. R. (2008) han dado una menor incidencia (4,71%). En los viñedos de Galicia se han localizado una incidencia superior a la nuestra con un 45% (Segura, 1993). También en la zona de Alicante los valores son muy altos siendo del 60% (López-Fabuel y col., 2013) y 57,89% y 69,47% tanto en hoja como en madera (Bertolini y col., 2011). En este caso si vemos la incidencia por variedades, la mayor incidencia la comparten Pardina y Eva con un 19% y 18% respectivamente y nuevamente Montúa es la que menos presenta con un 8% (Figura 4).

Tras los resultados obtenidos podemos concluir que, tras realizar una prospección de 280 cepas, 146 (51,78%) han resultado sanas para estos tres virus. Sin embargo, se realizarán estudios posteriores para descartar la presencia de los virus GLRaV-1 y ArMV. En cuanto al que mayor incidencia ha presentado en toda la región, ha sido GFKV (31,07%), sobre todo en la variedad Pardina (68,31%), Cayetana (43,2%) y Eva (42,2%) por lo que es de vital importancia seguir realizando más prospecciones de estas variedades para obtener un mayor número de clones sanos. En cambio, la variedad Montúa es la que menor incidencia ha registrado con un 25%.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el VI PLAN REGIONAL DE I+D+i Gobierno de Extremadura proyecto nº IB181180 y Grupo de Investigación AGA001 GR21196. Agradecimientos al fondo social europeo de garantía juvenil y al proyecto Agros 2022 (Fondos europeos de desarrollo regional). Agradecemos la ayuda al Servicio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio y a los expertos de Denominación de Origen Rivera del Guadiana Ángel Rodríguez y Marisol Argueta por su ayuda en la pre-selección de las cepas prospectadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias, M., Fresno, J., López, J.A., Escuer, M., Arcos, S.C. y Bello, A. (1997). Nemátodos, Virosis y Manejo del Viñedo en castilla-La Mancha. *Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, y Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha*.
- Bertolini, E., García, J., Yuste, A. y Olmos, A. (2010). High prevalence of vi-rases in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *Euro Journal Plant Pathology*. 128: 283-287.
- Charles, J.G., Cohen, D., Walker, J.T.S., Forgie, S.A., Bell, V.A. y Breen K.C. (2006). A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). *New Zealand Plant Protection*. 59: 330-337.
- Fresno, J. (1992). "Correlación bioecológica entre transmisores de virus (*Xiphinema ssp.*) y el virus de la "degeneración infecciosa" de la vid Entrenudo Corto (GFLV)". Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 262.
- Fresno, J., Arias, M., Del Moral, J. y Romero J. (1997). "Grapevine leafroll (GLRaV), fleco (GFKV) and grapevine fanleaf (GFLV) Xiphinema index in the vineyards of the Guadiana basin, Spain". *Proc. 12th Meeting ICVG*. Lisbon (Portugal): 115-116.
- García, P. y López J. (1991). Prospección del Grapevine Fanleaf virus (GFLV) y de los nemátodos transmisores en los viñedos de Castilla y León.
- González, M.D. (2010). Historia de la vid y del vino en Extremadura. En "La agricultura y la ganadería extremeñas: informe 2009" (pp. 263-278). Caja de Ahorros de Badajoz.

Gugerli, P. (2003). Grapevine leafroll and related viruses. *Extended Abstracts, 14th Meeting of the international Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, Locorotondo, Italy. 25-31.

Hernández, C.A., y Cano, J.A.R. (2008). Selección de la variedad Rufete en viñedos de la zona montañosa de la sierra de Salamanca. *Vida rural*, (270), 46-51.

López-Fabuel, I., Wetzel, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L.B., Yuste, A. y Olmos, A. (2013). Real-Time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*. 188: 21-24.

Martelli, G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1sup), 1-136.

Naidu, R.A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 1. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 127-139). Springer, Cham.

Padilla, V. (2004). Los parásitos de la vid. Estrategia de protección razonada. 5^a ed. MAPA y Mundi Prensa, Madrid. 259-271.

Osman, F., & Rowhani, A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133, 130-136.

Pearson, R.C. y Goheen, A.C. (1996). Plagas y enfermedades de la vid. *APS-Mundi-Prensa*.

Salazar, D.M., López, I., Recio, J.D. (2004a) Síntomas en las cepas atribuibles a las principales afecciones transmisibles por injerto en la vid. Virosis (I). *Phytoma ESPAÑA* 159: 38-48.

Salazar, D.M., López, I., Recio, J.D. (2004b) Síntomas en las cepas atribuibles a las principales afecciones transmisibles por injerto en la vid. Virosis (II). *Phytoma ESPAÑA* 160: 42-52.

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Porcentaje de incidencia de los virus GFKV, GFLV y GLRaV-3 en las cepas prospectadas.

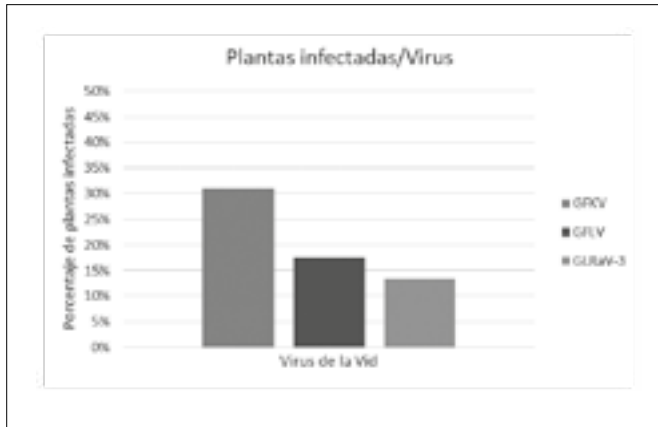


Figura 2. Incidencia de GFKV en las distintas variedades prospectadas.

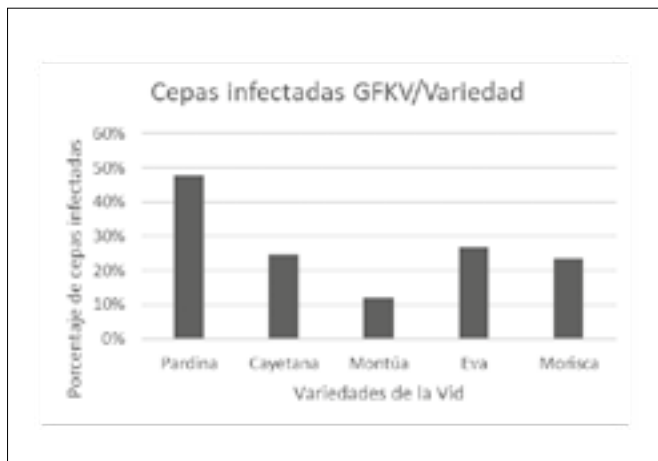


Figura 3. Incidencia de GFLV en las distintas variedades prospectadas.

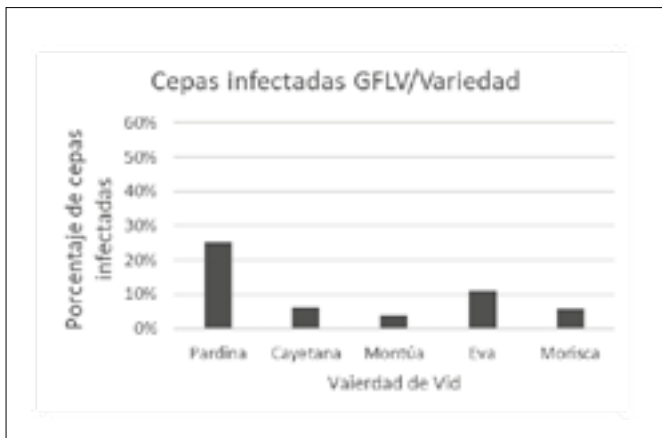


Figura 4. Incidencia de GLRaV-3 en las distintas variedades prospectadas.

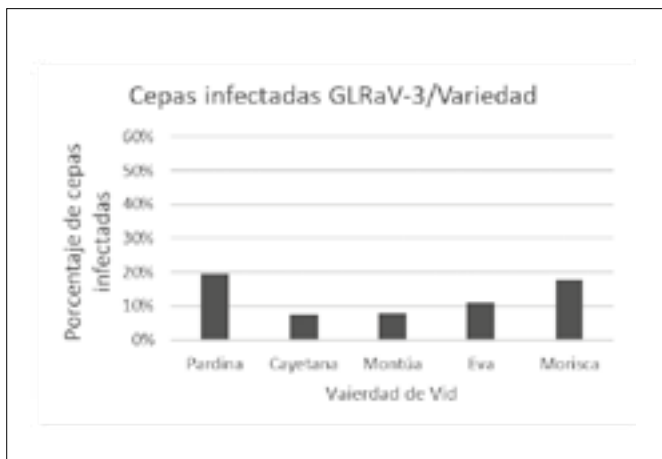


Tabla 1. Secuencias de los primers y sondas utilizadas para los virus GFKV, GFLV y GLRaV-3.

Virus	Primer/Sonda	Secuencia 5'-3'	Referencia
GFKV	GFKV OB F	CGAGAACTCTCTTTTCACCTC	Bertolini y col. 2010
	GFKV OB R	CCGGCGTGGATGTAGAG	
	GFKV OB S	6-Fam-ACCCTCGCCCTCATGCA-BHQ-1	
GFLV	GFLV-769f	GGGACCACTTAGGATGGAATGA	Osman y Rowhani (2006)
	GFLV-868r	TTCGGTGATATGGAGAGCGAAT	
	GFLV-799p	6-Fam-AAGTATCCCGGGGTGTATGTGTATGTGGAAGAGGA-BHQ-1	
GLRaV-3	GLRaV3-56f	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	Osman y Rowhani (2006)
	GLRaV3-285r	GTATTGGACTACCTTTCGGGAAAAT	
	GLRaV3-181p	6-Fam-CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGTGGACA-BHQ-1	