

[ FITOPATOLOGÍA EN VIÑEDO ]

## Desarrollo intercelular de *Plasmopara viticola* en genotipos de vid susceptibles y resistentes

**S. Boso Alonso**

**J. L. Santiago**

**V. Alonso-Villaverde**

**P. Gago**

**M.C. Martínez**

Misión Biológica de Galicia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

En este trabajo se estudia el modo de colonización del mesófilo de la hoja por parte del hongo (*P. viticola*), en dos genotipos de vid, uno altamente resistente (*Vitis riparia*) y otro altamente susceptible (*Vitis vinifera* cv. Albariño). Los resultados demuestran que el desarrollo fue diferente en las hojas de las plantas resistentes que en las de las plantas susceptibles.

**P**lasmopara viticola (Berk. and Curt.) Berl. and de Toni, es el agente causante del Mildiu en las Vitáceas, y es uno de los patógenos que provoca las mayores pérdidas en producción y calidad de los vinos, en los viñedos europeos. Aunque la enfermedad se controla con la aplicación de fungicidas, las condiciones climáticas en las que se desarrolla gran parte de la viticultura europea y dentro de España la de la zona Norte y Noroeste, obligan a los viticultores a la aplicación de numerosos tratamientos contra el mildiu (*P. viticola*), que no siempre son eficaces. Además de las pérdidas de cosecha que se producen algunos años, la aplicación continuada de tratamientos provoca un fuerte deterioro del medio ambiente, la aparición de ciertas resistencias, etc. Por todo ello, se buscan alternativas que eviten, o al menos disminuyan, el uso de este tipo de productos, de manera que favorezca una viticultura más sostenible, rentable, sana y respetuosa con

el medio ambiente. Una de las opciones es la utilización de plantas resistentes o con un cierto grado de resistencia.

Según diversos autores (Boubals, 1959, 1961; Galet, 1995; Ypema y Gubler, 2000), dentro del género *Vitis* hay grandes diferencias en cuanto a la resistencia a Mildiu. Mientras que la mayoría de variedades de la especie *Vitis vinifera* L., son susceptibles, otras especies de *Vitis* como las que proceden del continente Americano o Asiático, son parcialmente susceptibles o altamente resistentes. Sin embargo, di-



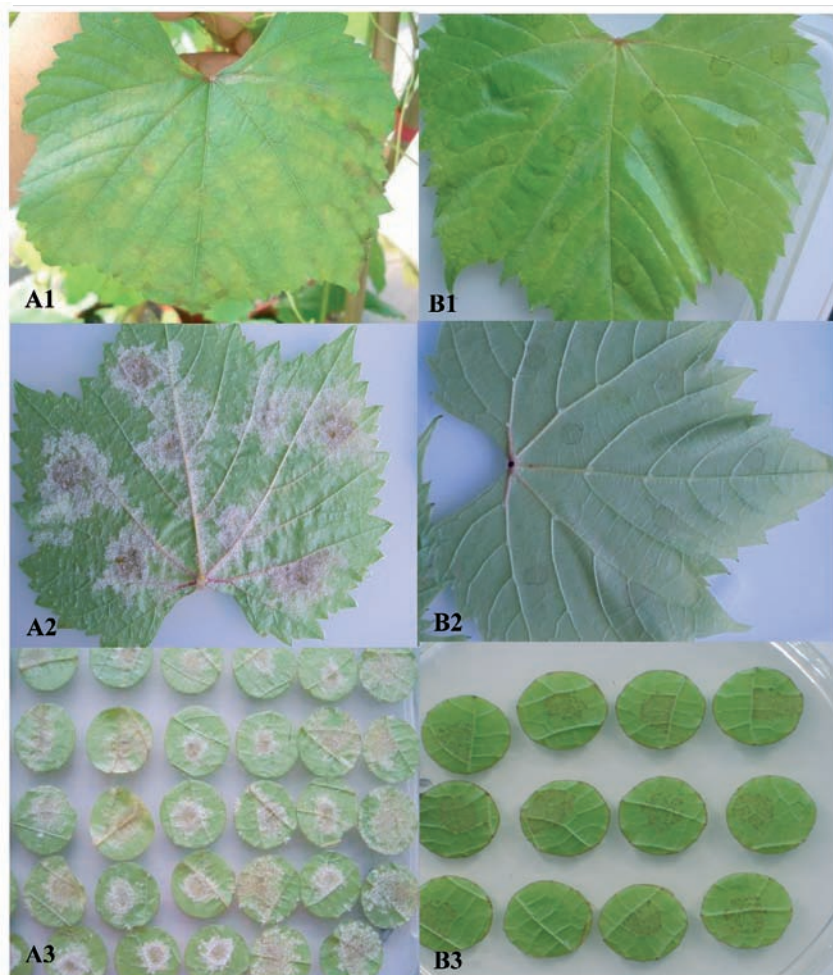
**La aplicación continuada de tratamientos provoca un fuerte deterioro del medio ambiente. Una de las opciones es la utilización de plantas resistentes**

versos estudios apuntan a la existencia, entre las diferentes viníferas, de distintos grados de susceptibilidad a Mildiu. En los genotipos susceptibles, *P. viticola* desarrolla esporangióforos sobre la superficie abaxial de las hojas infectadas, mientras que en los menos susceptibles, el hongo produce pocos esporangióforos y algunas manchas necróticas en los puntos de infección. En los genotipos resistentes, *P. viticola* provoca una respuesta de hipersensibilidad por parte de la planta, de manera que se interrumpe el desarrollo del hongo y sólo son visibles pequeñas manchas necróticas. La presencia de estas necrosis en las variedades resistentes, es algo ya demostrado por diferentes autores (Langcake et al., 1980; Barlass et al. 1987; Dai et al., 1995; Busam et al., 1997 a; Kortekamp et al., 1998; Brown et al., 1999 a; Unger, 2001; Dick, 2002; Rumbolz et al., 2002; Kortekamp y Zyprian, 2003; Kassemeyer, 2003; Boso et al., 2006). La respuesta de hipersensibilidad a la que se hace referencia, está relacionada con la muerte programada de las células alrededor del punto de la hoja en el que se produjo la infección, con la liberación de diferentes tipos de oxígeno reactivo (Raskin, 1992; Kortekamp y Zyprian, 2003), con procesos de lignificación, formación y síntesis de calosa alrededor de los estomas, con la producción de fitoalexinas, etc. Los distintos niveles de susceptibilidad a Mildiu también parecen estar relacionados con ciertas características morfológicas o histológicas de la planta (Ribereau-Gayón y Peynaud, 1971; Jeandet y Bessis, 1989; Staudt y Kassemeyer, 1995; Kortekamp y Zyprian, 1999; Kortekamp et al., 1999; Bessis et al., 2002; Gabler, 2003).

Aunque a mediados del siglo XX se iniciaron los primeros estudios sobre

**Foto 1:**

Expresión de los síntomas de *P. viticola* en hojas y discos en los genotipos susceptibles y resistentes de *Vitis*. A1-A3: *Vitis vinifera* cv. Albariño; B1-B3: *Vitis riparia*.



la susceptibilidad a Mildiu en viníferas, éstos se limitaban a las variedades más ampliamente conocidas a nivel internacional, empleando además escalas visuales subjetivas, basadas fundamentalmente en estudios de campo. Actualmente los avances en las técnicas de análisis y estudio, han permitido profundizar en determinados aspectos como la descripción y visualización de

la morfología y desarrollo del hongo. Se ha avanzado también en el estudio de las etapas del proceso de infección del Mildiu, así como la duración del período de incubación y la influencia de la temperatura, de la humedad relativa, o de la humedad sobre la hoja en el proceso de infección, período de incubación, y esporulación. (Blaeser y Weltzien, 1978; Kiefer et al., 2002;

Riemann et al., 2002; Rumbolz et al., 2002; Musetti, 2004; Boso et al., 2004; 2005a; 2006, Unger et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue analizar las diferencias en el ciclo asexual de *P. viticola*, en dos genotipos de vid, uno altamente resistente (*Vitis riparia*) y otro altamente susceptible (*Vitis vinifera* cv. Albariño), desde el inicio del ciclo con la entrada del hongo, hasta la producción de esporangios. Para ello se utilizó el método de la “Técnica de los discos” propuesto por Staudt et al. (1995) y por Rumbolz et al. (2002) y el método de la planta de Boso et al. (2006). Se observaron y se evaluaron los síntomas de la infección, midiendo la incidencia y severidad de esporulación y necrosis, y la densidad de esporulación. Para hacer el seguimiento de la evolución de la fase asexual del hongo en los discos, se utilizó un microscopio de fluorescencia, a través del cual se tomó nota, durante los cinco días de incubación, de diferentes parámetros como la frecuencia de vesículas subestomáticas, frecuencia de hifas, porcentaje de estomas infectados, porcentaje de haustorios, longitud de las hifas, etc.

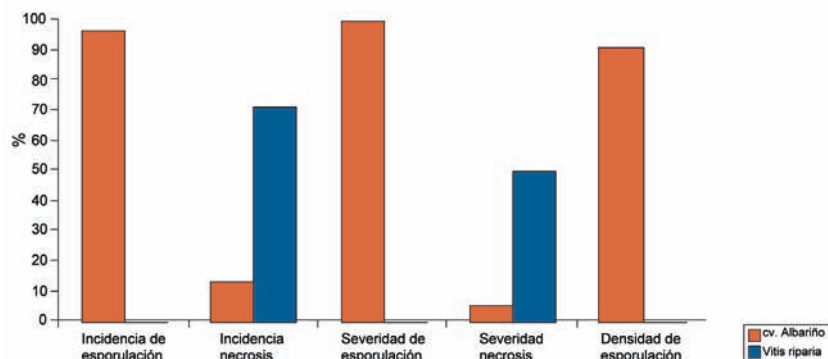
**Resultados**

Pueden verse en el **Gráfico 1** y en la **Foto 1** y demuestran que, tal y como ya se había observado en otros trabajos (Boso et al., 2006), el genotipo más susceptible presentó una severidad e incidencia de esporulación del 100%, mientras que en el genotipo resistente no pasó del 5%. Por el contrario, en el genotipo resistente el porcentaje de necrosis fue mucho más elevado que en los genotipos susceptibles.

El seguimiento mediante microscopio de fluorescencia nos ha permitido observar que en las primeras horas después de inocular, la velocidad de desarrollo de *P. viticola* fue muy lenta en ambos genotipos. Las esporas se dirigieron hacia los estomas de manera muy certera, y una vez aquí, se deshicieron de sus flagelos y se enquistaron (Kiefer et al. 2002). A continuación, se formó un tubo germinativo que alcanzó la cavidad subestomática y que posteriormente se dilató formándose la vesícula subestomática (**Foto 2**). De dicha vesícula, surgió una primera hifa (hifa primaria), que se fue desarrollando hasta formar el micelio, extendiéndose dentro del tejido de hoja, principalmente en el espacio intercelular del parénqui-

**Gráfico 1:**

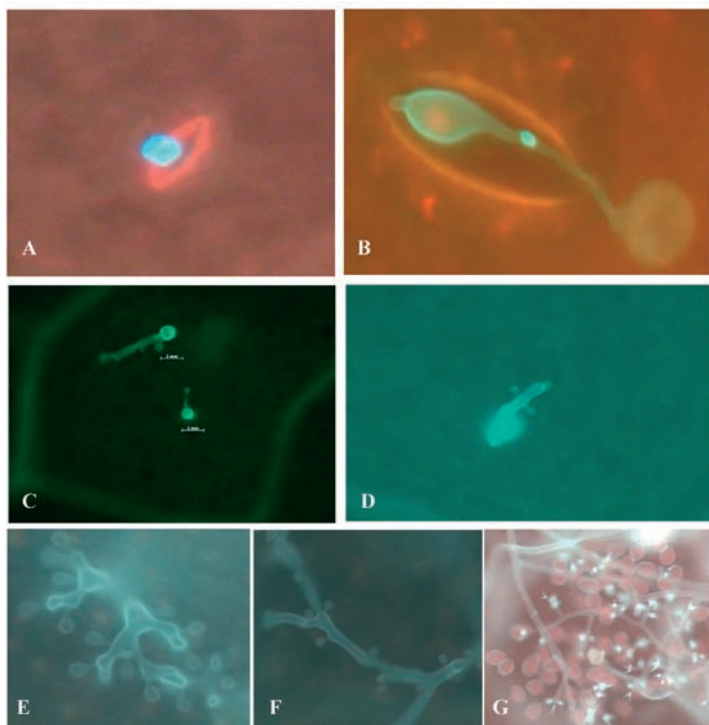
Parámetros de Incidencia y severidad de esporulación y necrosis, medidos en los dos genotipos de vid estudiados mediante la técnica de los discos y la de la planta.





## Foto 2:

Diferentes fases observadas mediante microscopía de fluorescencia en el proceso de colonización de *P. viticola*. A: vesícula subestomática; B: vesícula subestomática con septo; C y D: Elongación de hifa con haustorios; E y F: hifa bifurcándose, con haustorios y colonizando el espacio intercelular; G: Esporangióforos con esporangios libres llenos de zoosporas maduras.



ma esponjoso. Al mismo tiempo se formaron los haustorios que penetraron en las células de la hoja. En los primeros estadios las hifas avanzaron lentamente hasta que los haustorios estuvieron perfectamente desarrollados y fueron funcionales. Esta lentitud en el desarrollo probablemente fue debida a que las reservas almacenadas que presentaban las zoosporas eran muy pequeñas.

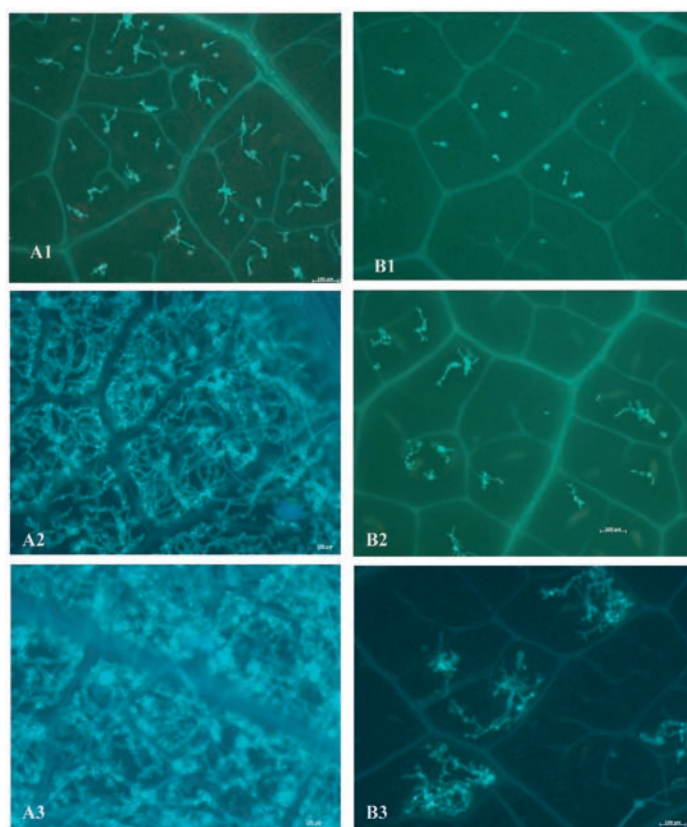
A partir de las 24h después de la inoculación (hpi), se empezaron a apreciar diferencias significativas entre ambos genotipos. En los genotipos susceptibles, los haustorios ya estaban totalmente desarrollados y las hifas se extendieron rápidamente entre las células del mesófilo de la hoja, tendiendo a llenar los espacios aéreos. A continuación, se observó la aparición de hifas bifurcadas y con una disposición irregular (Fotos 2 y 3), comportamiento característico en este estadio del desarrollo del hongo. A medida que transcurrió el tiempo, el área inoculada fue invadida por el hongo que se dispuso entre las células del tejido en empalizada, y posteriormente alcanzó la epidermis superior de la hoja, donde a través de

los estomas surgieron los esporangióforos. Dependiendo de la edad de la hoja, la lesión adquirió una morfología y un tamaño diferente. Así, en las hojas más viejas el esclerénquima o los tejidos lignificados actuaban a modo de barreras de contención. El micelio se acumuló contra los tejidos y no podía atravesarlos, pues las paredes celulares eran muy gruesas y los espacios intercelulares muy pequeños. A las 48hpi, se observaron muchas infecciones, con hifas de muchos tamaños, formando el típico micelio que se extendía a lo largo de los nervios de la hoja. A las 72hpi los esporangióforos con esporangios libres fueron perfectamente visibles (Foto 2).

*Vitis riparia*, por el contrario, a las 24hpi, presentó pocas infecciones con pocas hifas y con pocos haustorios, aunque estas eran gran tamaño (Foto 3). A las 48 hpi, se observaron todavía muchas vesículas subestomáticas con hifas primarias y un bajo porcentaje de hifas, de formación muy lenta y de muy pequeño tamaño. En este intervalo, se observó perfectamente como el desarrollo del hongo se frenaba y la situación era más o menos igual después de seis días, al cabo de los cuales se obser-

## Foto 3:

Proceso de colonización del espacio intercelular por *P. viticola* en los genotipos susceptibles (*Vitis vinifera* cv. Albariño) y resistentes (*Vitis riparia*), mediante microscopio de epifluorescencia y tinción con azul de anilina. A1-A3: cv. Albariño a las 24, 48 y 72 hpi respectivamente; B1-B3: *V. riparia* a las 24, 48 y 72 hpi respectivamente.



vabaron todavía infecciones que no habían evolucionado (característica de las plantas muy resistentes), e hifas de formación muy lenta. En algunos casos y muy raramente, los espacios intercostales estaban invadidos por el micelio, pero en baja frecuencia. En los genotipos resistentes, *P. viticola* no puede completar su ciclo de vida, como consecuencia de la rápida respuesta de defensa de la planta (aumento de la síntesis de fitoalexinas, procesos de lignificación, formación de calosa, presencia de polímeros de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3, proteínas relacionadas con la patogenicidad, etc).

## Conclusiones

Puede decirse que las primeras fases de desarrollo del hongo fueron lentas para ambos genotipos. La colonización por parte del micelio y la esporulación, fue muy rápida en el genotipo susceptible y casi inexistente en el resistente.

## Bibliografía

Queda a disposición del lector en: susanab@mbg.cesga.es •