

Influencia de las Técnicas de Cultivo sobre las Poblaciones de Nematodos Vectores de Virus y la Dispersión de GFLV en los Viñedos de Castilla-La Mancha

J. FRESNO, M. ARIAS Y J.A. LÓPEZ-PÉREZ

Se analiza la influencia que las técnicas de cultivo del viñedo en Castilla-La Mancha tienen sobre las poblaciones de nematodos vectores de virus y la dispersión del GFLV. El estudio se realiza a partir de más de 1000 muestras recogidas al azar entre los años 1989 y 1995 de escasa pluviometría, y 800 muestras tomadas entre 1997 y 2001 en zonas donde se ha introducido el riego y en material de replantación. Los resultados indican que en aquellos viñedos donde se ha introducido riego las poblaciones de nematodos aumentan considerablemente y la dispersión del virus en toda la finca e incluso en las colindantes es rápida. Se estudia asimismo la presencia de otros virus de importancia para el viñedo. Se plantea la necesidad de realizar estudios sobre la presencia de nematodos y virus en las fincas que se van a replantar, la conveniencia de utilizar siempre material certificado y el empleo de métodos de diagnóstico sensibles, que permitan la detección del virus en cualquier tejido de la planta y en el nematodo vector.

J. FRESNO: Dpto Biotecnología. SGIT-INIA. Ctra de La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.

M. ARIAS, J.A. LÓPEZ-PÉREZ: Dpto Agroecología, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano 115 dpdo, 28006 Madrid.

Palabras clave: *Xiphinema index*, GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV, riego.

INTRODUCCIÓN

La nematofauna asociada a los viñedos de La Mancha se caracteriza por la baja frecuencia y abundancia de especies patógenas, debido a las especiales características de la zona, con clima mediterráneo continental, la presencia de un horizonte petrocálcico en sus suelos y unas técnicas agronómicas tradicionales, que hacen que las plagas y enfermedades sean menos severas, permitiendo una agricultura con un uso mínimo de pesticidas (BELLO *et al.*, 1996). Los nematodos más importantes para el viñedo en esta región son los vectores del virus del "entrenado corto" (GFLV),

principalmente *Xiphinema index* (ARIAS *et al.*, 1997), ya que los formadores de nódulos se encuentran muy localizados (BELLO *et al.*, 1996). Los estudios realizados entre 1988 y 1995, años de escasa pluviometría, mostraron que el GFLV en La Mancha se encontraba disperso, presentando una incidencia del 12% ($\pm 0,025$), los focos de GFLV-*X.index* se mantenían en rodales muy localizados, que se extendían muy lentamente bajo las prácticas tradicionales de cultivo aplicadas en la zona, siendo las poblaciones de nematodos muy pequeñas y con escasa movilidad, sobre todo en la estación seca. Se ha comprobado asimismo que los diagnósticos visuales de GFLV no

son fiables, puesto que la sintomatología observada no siempre se corresponde con la presencia del virus y, por el contrario, cepas de apariencia sana y vigorosa contenían el virus (FRESNO y ARIAS, 1993; ARIAS, FRESNO y LÓPEZ, 1997).

Debido a que en el período de sequía entre 1988 y 1996 murieron muchas cepas, se han implantado nuevas técnicas de manejo (riego, espaldera, etc.) a fin de incrementar la producción, y se ha venido introduciendo material vegetal nuevo, con el consiguiente riesgo para el estado sanitario del viñedo en la región, ya que, por un lado, los nematodos vectores de GFLV incrementan sus poblaciones con el riego que, junto con el laboreo, favorece su dispersión y la del virus (ARIAS, FRESNO y LÓPEZ, 1997).

La localización de un viñedo en el que, como consecuencia de la introducción del riego por goteo, *X. index* se encontraba en el 80% de las muestras, con poblaciones que en algunos casos superaban los 500 individuos kg^{-1} de suelo, GFLV en el 54% y

con una correlación virus-vector del 66,6% (Fig.1), nos ha llevado a realizar un análisis de la evolución de ambos patógenos con los datos recogidos a lo largo de más de diez años, comparándolos con aquellos en que se ha introducido riego. Asimismo se ha estudiado la presencia de GFLV, detectable en cualquier época del año por las actuales técnicas de diagnóstico (FRESNO y ARIAS, 1993; NOLASCO *et al.*, 1993), y otros virus en material vegetal introducido recientemente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha basado en más de 1.000 muestras de suelo y material vegetal analizadas, para detectar la presencia y evolución de GFLV y de sus nematodos vectores, entre 1989 y 1996 (ARIAS *et al.*, 1997), en viñedos sometidos al manejo tradicional de la zona. Para la valoración de la influencia del riego en la evolución de ambos pa-



Fig. 1.-Viñedo degenerado por GFLV, tras la introducción de riego por goteo.

tógenos, se han estudiado puntualmente más de 500 muestras de material vegetal en una serie de fincas, donde se habían detectado focos de infección del virus y presencia del vector, en torno a Valdepeñas y Socuéllamos, en los parajes de "La Encomienda", "Casa Caballo" en la carretera de Torrenueva, finca "Los Córdobas" y en varias fincas de la carretera de Valdepeñas a Daimiel. Para la valoración del material vegetal de replantación se estudiaron entre 1999-2001 unas 300 muestras de material vegetal.

Los nematodos fueron extraídos por los métodos de centrifugación en azúcar (NOMBELA y BELLO, 1983) y sedimentación decantación (FLEGG, 1967), la presencia de GFLV se detectó por ELISA-Das e IC-RT-PCR, (ARIAS, FRESNO Y LÓPEZ, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han confirmado los resultados de ARIAS *et al* (1997) (Cuadro 1). El GFLV en los viñedos de La Mancha se encuentra por debajo del 12%, con una distribución amplia en la zona, sin que se observe una clara correlación entre su presencia y la sintomatología, además de las citas de ARIAS, FRESNO Y LÓPEZ, 1997, lo hemos detectado en Casa de los Árboles (Albacete). Los nematodos vectores se presentan también ampliamente distribuidos, hemos encontrado *X.index* en **Ciudad Real**: Casa de Marta, Villa Mercedes; **Cuenca**: Casa de los Pinos; **Toledo**: Ciruelos, Mora, y *X.italiae* en Camino de Vallas y Casas de Luna, (**Albacete**); Villa Mercedes (**Ciudad Real**); y *X.rivesi*, vector del nepovirus de vides americanas TRSV, en **Ciudad Real**: Alhambra, Santa Cruz de Mudela, Torre de Juan Abad, Villalba de Calatrava, y **Toledo**: Arisgotas, Ciruelos, Consuegra, Mora y Tembleque.

Sintomatología y presencia de GFLV. La relación entre la sintomatología observada y la presencia del virus del entrenudo

corto en los viñedos bajo manejo tradicional figura en el Cuadro 1, donde se observa que cepas sin sintomatología aparente se encontraban infectadas por el virus, mientras que otras que mostraban síntomas generales descritos para GFLV, clorosis o entrenudo corto no estaban afectadas. En los estudios que se llevaron a cabo en viñedos con y sin riego en 1997 se observa que, a pesar de haber elegido plantas sin y con distinta sintomatología (Figs. 2 y 3), todas resultaron estar afectadas por GFLV, encontrándose las mayores adsorbancias en cepas deprimidas y con mosaico amarillo (3,5), e incluso en cepas sin sintomatología aparente y con vigor (Cuadro 2).

Incidencia de *X.index*-GFLV. En los muestreos realizados en torno a Socuéllamos, Tomelloso y Valdepeñas (Ciudad Real) se ha comprobado mayor incidencia de GFLV en la zona, como consecuencia de la mayor pluviosidad en los últimos años y en aquellos viñedos en que se ha introducido riego.

En la carretera de Torrenueva (Ciudad Real), en tres viñedos próximos, situados a ambos lados de la carretera, uno en secano y dos con riego por goteo desde hace uno y dos años respectivamente, se ha comprobado que en aquéllos donde se ha implantado el riego la presencia de GFLV es del 100 y 61,5% respectivamente, el vector se encuentra en el 28,6 y 68,8%, con poblaciones comprendidas entre los 10 y 45 indiv. kg⁻¹ de suelo, siendo la incidencia virus vector del 28,6 y 53,8% respectivamente. En el viñedo mantenido sin riego, tanto el virus como el vector, aparecieron en el 31,3% de las muestras, con una correlación entre ambos del 6,3% (Fig.4).

Conviene destacar que en una parcela, replantada sobre una viña arrancada, donde se ha introducido riego un año se detectó el virus en portainjertos brotados, lo que indica su presencia en el viñedo antiguo y su rápida dispersión en la plantación nueva al introducir el riego. Los

Cuadro 1.—Poblaciones de *X.index*, GFLV y sintomatología (ARIAS *et al.* 1997)

Localidad	<i>X.index</i> (indv. kg ⁻¹ de suelo)	GFLV	Síntomas
Albacete:			
Almansa	—	+	generales GFLV
Buenavista	—	+	entrenudo corto
Casa Eugenio	30	+	cepas muertas
Casas de Luna	—	+	generales GFLV
Lezuza	—	+	entrenudo corto
Ossa de Montiel	5	+	ninguno
Sta María de los Llanos	—	+	clorosis
Tobarra	95	+	generales GFLV
Villarrobledo	5	—	clorosis
Villarrobledo	—	+	clorosis
Ciudad Real:			
Alameda de Cervera	5	+	clorosis
Aldea del Rey	—	+	clorosis
Alhambra	—	+	clorosis
Almagro	10	+	ninguno
Camino de Vallas	—	+	generales GFLV
Carrizosa	10	—	clorosis
Casa Cristales	—	+	clorosis
Daimiel	30	+	filoxera
Guadianeja, La	—	+	ninguno
Malagón	20	—	entrenudo corto
Manzanares	—	+	clorosis
Manzanares	10	+	generales GFLV
Mesas, Las	5	—	entrenudo corto
Moral de Calatrava	5	—	generales GFLV
Pedro Muñoz	5	+	entrenudo corto
Santa Cruz de Mudela	—	+	ninguno
Santuario de Alarcón	5	—	generales GFLV
Socuéllamos	5	+	entrenudo corto
Socuéllamos	15	+	diversos
Solana, La	—	+	entrenudo corto
Terrinches	20	+	generales GFLV
Tomelloso	—	+	clorosis
Valdepeñas	—	+	clorosis/ent.corto
Valdepeñas	20	+	ninguno
Villanueva de los Infantes	10	—	entrenudo corto
Cuenca:			
Carrascosa	—	+	clorosis
Casas de Guijarro	5	—	entrenudo corto
Laguna de Majavacas	5	—	entrenudo corto
Provencio, El	620	+	clorosis
Tarancón	—	+	clorosis
Toledo:			
Corral de Almaguer	—	+	entrenudo corto
Corral de Almaguer	—	+	filoxera
Madridejos	—	+	clorosis
Mora	10	+	clorosis
Noblejas	5	+	filoxera
Quintanar de la Orden	—	+	clorosis
Toboso, El	—	+	generales GFLV
Villafranca de los Caballeros	—	+	clorosis



Fig.2.-Sintomatología general de GFLV en campo.

Cuadro 2.-Relación entre sintomatología, virus, nematodos y riego

Paraje	Riego	Sintomas	<i>X.index</i> indv. kg ⁻¹	<i>X.italiae</i> indv.kg ⁻¹
La Encomienda (finca 1)	no	mosaico amarillo	—	—
	no	clorosis férrica	—	—
La Encomienda (finca 2)	no	mosaico amarillo	—	—
	no	mosaico amarillo	—	—
	no	sin síntoma	30	—
La Encomienda (finca 3)	goteo	mosaico amarillo	35	—
	goteo	cepa deprimida	15	—
Casa Caballo (finca 1)	no	mosaico amarillo	55	10
	no	cepa vigorosa	—	—
Casa Caballo (finca 2)	goteo	mosaico amarillo	75	5
	goteo	sin síntoma	60	—

resultados fueron similares en los parajes de “La Encomienda”, “Los Córdoba” y a 11 km de Valdepeñas en la carretera de Daimiel (Cuadro 2), de ahí la conveniencia de realizar muestreos intensivos en la zona a fin de determinar el problema real que pueden representar estos patógenos al modificar los sistemas de manejo del viñedo.

Resultados similares se han encontrado en las zonas de Campo de Calatrava, Daimiel, Torrenueva y Valdepeñas (Ciudad Real), donde las viñas se encontraban degeneradas o los rodales con sintomatología de GFLV habían aumentado considerablemente, con la introducción de riego reciente; mientras que en las mantenidas bajo el manejo tradicional existían algunas cepas



Fig. 3.-Rodal de GFLV en laboreo tradicional.

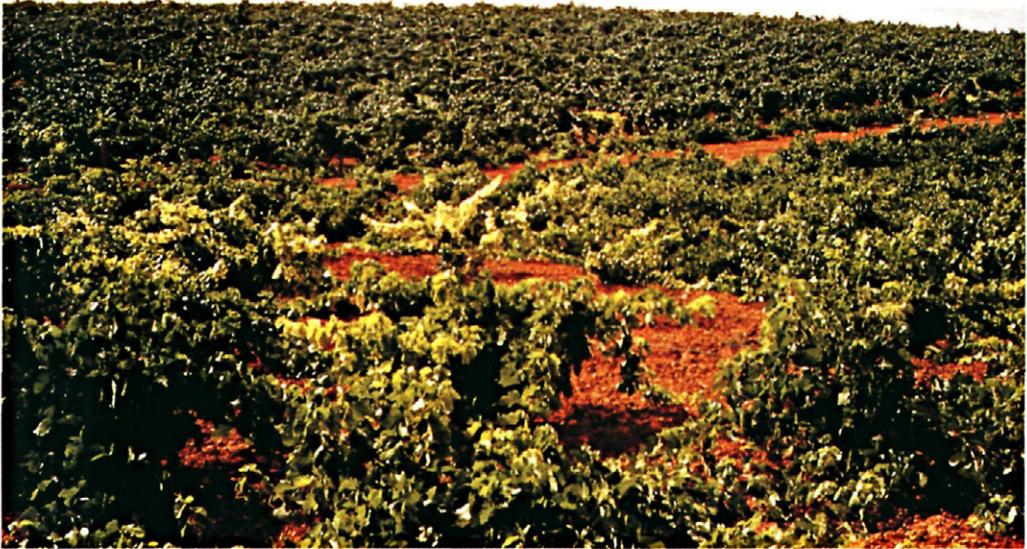


Fig. 4.—Panorámica de dos viñedos infectados por GFLV donde, en el de la parte inferior se ha introducido riego.

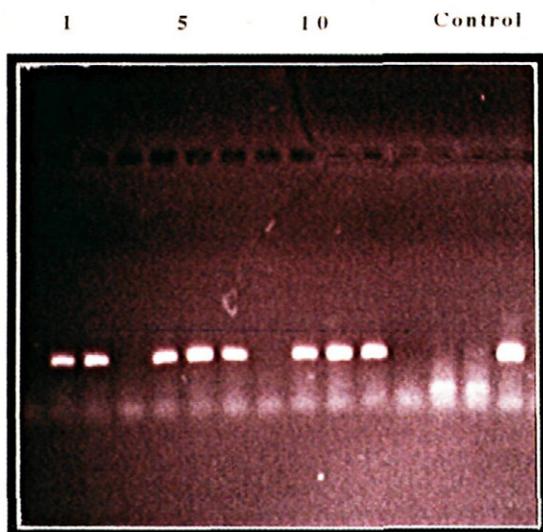
arrancadas pero el aspecto general de la finca era mejor. Sin embargo, en dichas zonas y en Villanueva de los Infantes, Cózar y Socuéllamos también se han detectado rodales que manifiestan mosaico amarillo y bandedo de venas, posiblemente debido a la

mayor pluviometría de los últimos años. Efectos similares se han observado en Campo de Calatrava en viñedos con riego por aspersión.

En resumen, se observa la presencia generalizada de síntomas de mosaico amari-

Cuadro 3.—Poblaciones de *X.index* y presencia de GFLV en los viñedos con riego

Valdepeñas		Socuéllamos	
<i>X.index</i> (indv.kg ⁻¹ suelo)	GFLV	<i>X.index</i> (ind kg ⁻¹ suelo)	GFLV
70	+	50	-
50	+	10	+
100	+	10	+
10	+	10	+
10	+	10	+
10	+	10	-
—	+	10	-
10	+	—	+
30	+	80	+
—	+	—	-
—	-	30	+
60	+	80	-
30	+	—	+
—	-	—	+
10	-	10	+
		30	+



Detection of GFLV in *Xiphinema spp.* by PCR

Fig. 5.—Detección de GFLV en *X.index* por IC-RT-PCR.

llo, bandeado de venas, deformación de madera, corrimiento de uva, maduración irregular, etc. en los viñedos donde se ha introducido riego, así como un considerable incremento de las poblaciones de *X.index* y, en consecuencia, de la dispersión de GFLV (Cuadro 3), que suele extenderse por todo el viñado; mientras que en aquellos en que se ha mantenido el sistema tradicional de cultivo, la enfermedad y los patógenos permanecen en focos estabilizados durante años.

Asimismo, se ha observado un aumento considerable de las poblaciones de *X.index* (de 5 a cerca de 1.000 indiv. 100⁻¹ cc de suelo), con la introducción de riego en el sistema, los individuos pueden encontrarse en los horizontes superficiales del suelo incluso en los períodos más calurosos y, como consecuencia la infección de GFLV se extiende rápidamente por toda la finca, en contraste con lo que ocurría con el manejo tradicional del viñado, donde los rodales de la virosis permanecían estables du-

rante muchos años, las poblaciones de nematodos eran muy bajas y en los períodos más calurosos sólo se encontraba algún individuo en los horizontes argílicos más profundos.

Otros virus. Paralelamente se ha estudiado la presencia de otros virus de interés para el viñado, encontrando closterovirus del enrollado, GLRaV-1 y GLRaV-3, en torno al 4% y 20% respectivamente, y el virus del jaspeado o Fleck (GFkV) en el 32% de las muestras estudiadas.

Estado sanitario de las fincas replantadas. En material de diferentes partes de La Mancha, alguno procedente de consultas, se han detectado virus del enrollado y del jaspeado, tanto en viñedos establecidos de hace tiempo como en los recién implantados con cambio de variedades, en que los patrones y/o las variedades supuestamente procedían tanto de material estándar como certificado.

En el material vegetal procedente de fincas donde se ha realizado una replantación con material certificado y estándar, principalmente de las zonas de Socuéllamos, Tomelloso y Valdepeñas (Ciudad Real), se han encontrado el nepovirus GFLV en el 5%, los closterovirus o virus del enrollado transmitidos por cochinillas, GLRaV-1 y GLRaV-3, en el 3 y 11% respectivamente, y el virus del jaspeado o Fleck, de vector desconocido, en el 30% de las muestras. Todo ello parece indicar la existencia de algún fallo en el control sanitario, en la comercialización, así como la posible existencia de vectores en las fincas replantadas. Todo ello indica el riesgo de utilizar material que no esté certificado, tanto para el patrón como para los injertos, ya que la introducción de material contaminado unida a la presencia de vectores puede dar lugar a la permanencia de los virus en la zona, así como a la contaminación y expansión a viñedos colindantes.

CONCLUSIONES

La aparición de nuevos focos con sintomatología de GFLV, presumiblemente como consecuencia de la mayor pluviometría de los últimos años, la rápida dispersión del virus en los viñedos infectados, como consecuencia de la implantación del riego, y la distribución y aumento de las poblaciones de los nematodos vectores, confirma las observaciones de ARIAS, FRESNO y LÓPEZ (1997) al respecto, destacándose, una vez más, la necesidad de realizar estudios representativos sobre la sanidad del viñedo, previos a la introducción de nuevas cepas en plantaciones totales o parciales. La introducción de riego en aquellos viñedos donde existe GFLV y *Xiphinema index*, aumenta considerablemente las poblaciones de nematodos y en consecuencia la extensión de la enfermedad.

Las nuevas infecciones en las fincas de replantación pueden ser consecuencia DE la introducción de material vegetal que no estaba libre de virus o a la presencia de vectores. La existencia de problemas no identifi-

cados en relación con estos virus lleva a considerar la conveniencia de realizar estudios más profundos, teniendo en cuenta virus que no han sido estudiados y que se vienen incluyendo en los programas sobre los virus del viñedo que ha recomendado la CEE.

Hay que destacar que la mayor incidencia de GFLV se ha encontrado asociada a plantas con clorosis o deprimidas, pero también en aquellas que mostraban mosaico amarillo e incluso en ausencia de síntomas. Todo lo cual parece confirmar la inexistencia de una correlación clara entre sintomatología y virosis, tal y como se viene observando.

El hecho de que el GFLV puede detectarse en cualquier época del año y en cualquier tejido de la planta, es de gran interés en programas de selección sanitaria y en el control. Además es conveniente detectar simultáneamente otros virus de control obligatorio en normativas europeas. Se recomienda utilizar métodos de diagnóstico sensibles como es el IC-RT-PCR, sobre todo en la actualidad en que estas técnicas se están automatizando de manera similar a ELISA.

La posibilidad de detectar el virus en un solo nematodo por IC-RT-PCR (Fig.5) o en cinco nematodos por ELISA (FRESNO *et al.*, 1996) es muy importante para los servicios de diagnóstico y cuarentena, en la implantación de cultivos en zonas infectadas, y para la introducción de modificaciones en las técnicas de cultivo, como por ejemplo el riego.

Por último se ha comprobado la presencia del virus del jaspeado (GFkV), los virus del enrollado, GLRaV-1 y GLRaV-3, cuyo estudio se viene recomendando para los viñedos de la UE.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Antonio Bello por sus sugerencias y continuo estímulo, a Baltasar Gallego y Juan Ruíz, de la Estación Enológica de Valdepeñas, por su desinteresada ayuda en la localización de las fincas y los síntomas, a Casimiro Martínez por su ayuda técnica.

ABSTRACT

The influence of vineyard crop techniques in Castilla-La Mancha on virus vector nematode populations and GFLV dispersal is analysed. The study has been done on the basis of more than 1000 samples taken at random between 1989 and 1995, and some 800 samples recovered between 1997 and 2001 in zones where irrigation was introduced and replanting are carried out. Results show that in those vineyards with presence of GFLV and their vector nematodes, in which irrigation has been introduced, nematode populations increase considerably as well as virus dispersal. The presence of other virus of interest to the grapes is also studied. The importance of carrying out studies on nematodes and virus presence before replanting and introduce irrigation is pointed out, as well as the interest of using always certified plants and to apply sensitive diagnostic methodologies to detect the virus in any plant tissue and even inside the vector nematode.

Key words: *Xiphinema index*, GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV, irrigation.

REFERENCIAS

- ARIAS, M., FRESNO, J. y LÓPEZ, J. A. 1997. Influence of agronomic techniques on the epidemiology of GFLV. *12th Meet.ICVG*, Lisboa, 125-126.
- ARIAS, M., FRESNO, J., LÓPEZ, J. A., ESCUER, M., ARCOS, S. C. y BELLO, A. 1997. *Nematodos, Virosis y Manejo del Viñedo en Castilla-La Mancha*. CSIC-JCCLM, Madrid, 117 pp.
- BELLO, A., REY, J. M., ARIAS, M. y GONZÁLEZ, J. A. 1996. Valores agroambientales de los viñedos de La Mancha y protección de cultivos. In: A.Salinas, F.J.Montero, E. Rodríguez de la Rubia (Eds). *La Vid y el Vino en Castilla-La Mancha*. Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, 61-81.
- FLEGG, J. M. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Ann.appl.Biol.*, 60: 429-437.
- FRESNO, J. y ARIAS, M. 1993. Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) along the whole year and its vector nematode *Xiphinema index*. *11th Meet.ICVG*, Montreux, Switzerland, 148-150.
- FRESNO, J., BLAS, C. DE, ARIAS, M. y ROMERO, J. 1996. Detección del nepovirus del entrenudo corto infeccioso de la vid en su nematodo vector por ELISA y PCR. *VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología*, 83.
- NOLASCO, G., BLAS, C. DE, TORRES, V. y PONZ, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and survival pathogens. *J.Virol.Methods*, 45: 201-218.
- NOMBELA, G. y BELLO, A. 1983. Modificaciones al método de extracción de nematodos fitoparásitos por centrifugación en azúcar. *Bol.Serv.Plagas*, 9: 183-189.

(Recepción: 10 de octubre de 2001)

(Aceptación: 16 de octubre de 2001)