

UTILIZACION DEL CULTIVO IN VITRO DE LA VID PARA EL ESTUDIO DE LAS RELACIONES PATOGENO-HOSPEDADOR

(Resumen del informe presentado a la Asamblea General de la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV))

J.M. Arregui
M.M. López
J. Juárez
N. Durán-Vila
Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA)
46113-Moncada (Valencia)
España

A. García de Luján
Estación Experimental
Rancho de la Merced
Jerez de la Frontera (Cádiz)
España

Abstract

We are presenting a summary of the information reported at the General Assembly of the OIV on grapevine tissue culture. The utilization of in vitro culture of grapevines on several ongoing research projects in bacteriology, virology and sanitary improvement is discussed. They include: a) studies on the sensibility of several grapevine varieties to Xanthomonas ampelina, b) production of viroid-free plants; c) sanitary improvement; and d) micropropagation.

Resumen

El objetivo de esta comunicación es ofrecer un resumen en castellano del informe sobre cultivo de tejidos de la vid presentado en la Asamblea General de la OIV. Se discute la utilización del cultivo in vitro de la vid en varios proyectos en curso en las áreas de bacteriología, virología y mejora sanitaria en general. Los temas tratados son: a) estudio de la sensibilidad de diversas variedades de vid a Xanthomonas ampelina; b) obtención de plantas libres de viroides; c) mejora sanitaria; y d) micropropagación.

1. Introducción

Desde los inicios del cultivo in vitro de la vid hasta hoy se han descrito un gran número de protocolos con distintos objetivos. Dichos objetivos se han centrado sobretudo, en el desarrollo de técnicas que pudieran incidir en la mejora de la calidad de la uva y el vino. Dichas técnicas se han aplicado en proyectos básicos de mejora genética, mejora sanitaria, fisiología, patología y conservación de germoplasma. Sin embargo hay que resaltar por el impacto que han tenido en el sector productivo, la

Actas del III Congreso, S.E.C.H. 1988

micropropagación (Bass et al., 1981; Silvestroni, 1981) y la obtención de plantas libres de virus (Galzy, 1972, Gifford y Hewitt, 1961, Engelbrecht y Schwerdtfeger, 1979).

El objetivo de esta presentación es describir la utilización del cultivo in vitro de la vid como técnica indispensable para el desarrollo de diversas investigaciones que se están efectuando en las áreas de bacteriología, virología y mejora sanitaria en general.

2. Estudio de la sensibilidad de diversas variedades de vid a Xanthomonas ampelina

La necrosis bacteriana de la vid, causada por la bacteria Xanthomonas ampelina, es una enfermedad presente en diversas zonas españolas (Aragón, Rioja y Galicia) que afecta aproximadamente a más de 10.000 Ha (López et al., 1977). La importancia de los daños causados por esta bacteriosis es muy variable ya que las condiciones climáticas del año, determinan en gran medida, la intensidad de los daños. Los métodos de lucha contra la enfermedad se limitan a medidas profilácticas y tratamientos cúpricos, que no son suficientes para controlar la enfermedad en años favorables al desarrollo de la misma. Por ello el estudio de la sensibilidad a X. ampelina de distintas variedades de vid, es esencial para determinar las variedades a utilizar en las zonas donde la enfermedad es endémica. Los ensayos de sensibilidad en campo presentan múltiples inconvenientes: duración y costo de los ensayos, dependencias de condiciones climáticas, necesidad de establecerlos en zonas infectadas, etc. Asimismo los ensayos en invernadero precisan de costosas instalaciones con elevados gastos de mantenimiento. Las dificultades de realización de los ensayos con plantas de viña en campo o invernadero, han llevado al estudio de distintos métodos de inoculación de plantas de vid cultivadas in vitro y a comparar la sensibilidad varietal en campo, e in vitro.

Para la obtención de plantas in vitro se empleó el método descrito por Silvestroni (1981). Se ensayaron distintos tipos de inoculación de las viñas cultivadas in vitro utilizando suspensiones bacterianas de 10 cel/ml: depósito de una gota en plantas no heridas, riego, pulverización de las hojas, inoculación mediante corte del peciolo de una hoja con tijeras que habían sido sumergidas en la suspensión bacteriana y decapitación con tijeras también pasadas por la suspensión de inóculo.

En las plantas inoculadas por los distintos métodos se observaron tres tipos de síntomas: proliferaciones, necrosis y chancros. Dependiendo del tipo de inoculación, la velocidad de aparición de los síntomas, fué variable, oscilando entre 10-20 días para la decapitación y 60-120 días para el riego con suspensión bacteriana. Se seleccionó el método de decapitación de las plantas por su mayor homogeneidad y repetibilidad, así como por la sencillez de realización y la rapidez de aparición de los síntomas.

Se ha aplicado dicho método al estudio de las diferencias en sensibilidad varietal a 6 variedades cultivadas in vitro, y se han comparado los resultados obtenidos in vitro con los de los ensayos de campo (López et al., 1987). Se ha constatado que la intensidad de los síntomas en respuesta a distintas concentraciones bacterianas, y el estado de las plantas a los tres meses de la inoculación, pareció mostrar correspondencia entre la sensibilidad en campo e in vitro.

Si se confirma la correlación existente entre ambos tipos de inoculación, la técnica de decapitación de planta cultivada in vitro, podrá ser utilizada como un método rápido de evaluación de la sensibilidad varietal, así como para el estudio de distintos aspectos de la relación patógeno-hospedador.

Las ventajas de estos tipos de inoculación se deben a la posibilidad de utilizar gran número de plantas homogéneas, sin dependencia estacional ni de parcelas, y en condiciones controladas, siendo un método rápido y económico que presenta una elevada seguridad frente a la posible diseminación de la bacteria.

3. Obtención de plantas libres de viroides.

Las investigaciones llevadas a cabo en distintos países indican que existen varios viroides que se replican en los tejidos de la vid (Flores et al., 1985, Sano et al., 1985 y Semancik et al., 1987).

Una prospección de viroides efectuada en 60 variedades de vid cultivadas en España ha permitido detectar tres viroides distintos (GV-1, GV-2 y GV-3) directamente de la vid cuyo tamaño oscila entre 300 y 370 nucleótidos. Mediante inoculaciones de preparaciones obtenidas a partir de tejidos de vid en ginura, se ha identificado otro viroide al que inicialmente se denominó GVs (Flores et al., 1985) y que ha sido recientemente caracterizado como una raza del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVgv). Se han detectado GV-1 y GV-2 en 58 de las 60 variedades analizadas, mientras que GV-2 se encuentra presente en 7 de ellas y GVs solo en la variedad Bobal. No se ha encontrado ninguna variedad libre de viroides.

La enorme difusión de viroides en la vid probablemente obedezca a diversos factores: la propagación vegetativa que permite la transmisión ya sea a través del portainjerto o de la variedad, el intercambio indiscriminado de material vegetal y la transmisión mecánica mediante los instrumentos de poda y recolección.

La relación causa-efecto entre estos cuatro viroides y las enfermedades descritas en vid no es todavía clara. Por tanto deben considerarse varias hipótesis alternativas: a) que los viroides sean agentes causales de algunas de las enfermedades de etiología desconocida que afectan a la vid; b) que los viroides sean agentes causales de enfermedades todavía no descritas; c) que los viroides sean componentes de un complejo capaz de inducir una enfermedad; y d) que

sean agentes crípticos o latentes que produzcan solamente respuestas extremadamente débiles. Sin embargo los estudios de infectividad y patogénesis se han visto limitados al no disponer de material libre de viroides. Los programas de mejora sanitaria que han servido de base para la obtención de material libre de virus, tradicionalmente se han basado en la selección clonal y sanitaria, y en la utilización de tratamientos de termoterapia no son efectivos para la eliminación de viroides (Lizarraga et al., 1980; Stace-Smith y Mellor, 1970).

Con el fin de continuar las investigaciones es imprescindible disponer de variedades libres de viroides. Se ha puesto a punto la técnica de cultivo in vitro de ápices caulinares de pequeño tamaño, que sin la aplicación de termoterapia permita la obtención de material libre de viroides (Duran-Vila et al., 1988). Actualmente se está aplicando esta para obtener plantas libres de viroides de 15 variedades de vinificación, 2 variedades de uva de mesa y 8 patrones. Una vez iniciado el cultivo debe transcurrir un periodo, que puede oscilar desde 2 meses para la variedad Cabernet Sauvignon a más de un año para algunos cultivares de la variedad Palomino, hasta que se observa el desarrollo de uno o varios brotes. Estos brotes después de transferidos a medio sin benciladenina, enraizan y pueden trasplantarse a suelo.

La supervivencia y desarrollo de los ápices presenta oscilaciones importantes (30-40% en las variedades Sauvignon Blanc y Merlot, hasta 100% en la variedad Zinfandel y los patrones LN33 y 043-43). Los datos disponibles hasta el momento indican que la eficacia en la eliminación de viroides también varía de unas variedades a otras. El GV2 y GV3 se han eliminado en todos los casos, mientras que el GV1 es difícil de eliminar en las variedades Cabernet Franc y Chardonnay.

4. Mejora sanitaria

Para la mejora del material vegetal de vid es imprescindible tener en cuenta tanto la variabilidad genética como el estado sanitario del material de partida. Cualquier programa de mejora conlleva la selección de clones con caracteres agronómicos y de calidad deseables, que debe complementarse con la calidad sanitaria del material seleccionado. En un trabajo de selección sanitaria dentro de una variedad, no siempre es factible encontrar clones sanos en la población cultivada. Incluso tratándose sólo de las afecciones "court noué", "enroulement" y "marbrure", hay variedades en las que resulta difícil seleccionar individuos sin la presencia de alguno de estos tres agentes patógenos transmisibles por vía vegetativa, por lo que es preciso recurrir a técnicas especiales de mejora sanitaria.

La mayoría de programas de mejora sanitaria de vid se basan en la aplicación de tratamientos de termoterapia. Sin embargo existe abundante información sobre la eficacia de

las técnicas de cultivo in vitro en la obtención de plantas libres de virus tanto en vid como en otros cultivos, incluso cuando no se utilizan tratamientos de termoterapia (Barlass et al., 1982; Galzy, 1972; Mori y Hosokawa, 1977).

Recientemente en España se ha iniciado un programa de mejora sanitaria de selecciones clonales de vid mejor adaptadas a las condiciones de cultivo de la Comunidad Valenciana. Se han utilizado las técnicas de cultivo de ápices caulinares de pequeño tamaño. El programa incluye dos variedades locales de uva de vinificación (Bobal y Monastrell) y dos variedades de uva de mesa (Moscatel y Roseti), y tiene como objetivo sanear 2 selecciones de cada una de ellas.

En 1986 se iniciaron los tests de indexing de las plantas madre, y en 1987 se efectuaron los primeros cultivos in vitro. En la actualidad se cuenta con plantas procedentes de 21 ápices de Bobal, 26 de Monastrell y 29 de Roseti en distintas fases de crecimiento in vitro, y se han iniciado los primeros trasplantes a suelo.

5. Micropropagación

La utilización de la micropropagación en vid ha estado fundamentalmente ligada a programas de mejora genética o sanitaria que exigían la multiplicación rápida del material obtenido.

El empleo de la micropropagación en nuestro programa viene condicionado, por las necesidades derivadas de los proyectos de investigación en X.ampelina, viroides y mejora sanitaria, y tiene como objetivo la multiplicación rápida de las plantas a emplear.

Las técnicas utilizadas son variaciones de las descritas por otros autores (Silvestroni, 1981). Brotes de alrededor de 0.5-1 cm obtenidos a partir de segmentos nodales o ápices caulinares se transfieren a medio de micropropagación con 1 mg/L de benciladenina con lo que se consigue una nueva proliferación de brotes. Cuando es preciso obtener muchas plantas en poco tiempo, se repican también segmentos nodales lo cual permite incrementar más el número de cultivos obtenidos en cada repicado. Aunque en teoría esta operación se puede repetir indefinidamente, no es aconsejable si se quiere evitar la selección o acumulación de posibles fenotipos aberrantes. En nuestro caso efectuamos un máximo de 8 repicados.

Los brotes así obtenidos se transfieren a medio sin benciladenina para su enraizamiento, y una vez enraizados se trasplantan a suelo. Se observan oscilaciones importantes en la velocidad de crecimiento, el índice de proliferación, el enraizamiento y la supervivencia al trasplante.

Referencias

- Barlass, M., Skene, K.G.M., Woodham, R.C. and Krake, L.R., 1982. Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture. *Ann. Appl. Biol.* 101, 291-295.
- Bass, P. and Legin, R. 1981. Thermothérapie et multiplication in vitro d'apex de vigne: application a la separation ou à l'elimination de divers maladies de tipe virale et à l'evaluation des dégats. Séance, 922-933.
- Duran-Vila, N., Juárez, J. and Arregui, J.M. 1988. Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Am J. Enol. Vit.* 39 (3): 217-220.
- Engelbrecht, C.J. and Schwerdtfeger, U. 1979. In vitro grafting of grapevine shoot apices as an aid to the recovery of virus free clones. *Phytophylactica* 11, 183-185.
- Flores, R., Duran-Vila, N., Pallás, V. and Semancik, J.S. 1985. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines, *J. Gen. Virol.* 46, 205-2102.
- Galzy, R. 1972. La culture in vitro des apex de *Vitis rupestris*. *C.R. Heb. Acad. Sc.* 274, 210-213.
- Gifford, E.M. and Hewitt, W.B., 1961. The use heat therapy and in vitro shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 12, 129-130.
- Lizarraga, R.E., Salazar, L.F., Roca, W.M. and Shilde-Rentscheler, L. 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature meristem culture. *Phytopathology* 70, 754-755.
- López, M.M., Arregui, J.M. and Navarro, L. 1985. Nueva técnica de inoculación de Xantomonas ampelina de plantas de viña cultivadas in vitro para el estudio de las relaciones hiesped/parásito. Proc. II Congreso Nacional de Fitopatología, 45-50.
- López, M.M., Gracia, M., Sampayo, M., 1987. Current status of Xantomonas ampelina in Spain and susceptibility of Spanish cultivars to bacterial necrosis. *Bulletin OEPP*, 17, 231-236.
- Mori, K. and Hosokawa, D., 1977. Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. *Acta Horticulturae* 78:389-396.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. 1985. A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen. Virol.* 66, 333-338.
- Semancik, J.S., Rivera-Bustamante, R. and Goheen, A.C. 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNAs in grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (1), 35-40.
- Silvestroni, O. 1981. Prime esperienze sulla micropropagazione della vite europea. *Vigne vini* 8 (10), 31-37.
- Stace-Smith, R. and Mellor, F.C. 1970. Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology* 60, 1857-1858.