

Virus que afectan el cultivo de la vid en Chile

Descripción, diagnóstico y estrategias de control

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS



Editoras

Mónica Madariaga Villarroel

Nelly Nova Lobos

ISSN 0717-4713

COLECCIÓN LIBROS INIA N° 46

Virus que afectan el cultivo de la vid en Chile

Descripción, diagnóstico
y estrategias de control

Editoras

Mónica Madariaga Villarroel

Nelly Nova Lobos

Colección Libros INIA / N° 46

INIA La Platina

Santiago, Chile, 2024

Virus que afectan el cultivo de la vid en Chile
Descripción, diagnóstico y estrategias de control

Editoras

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra. en Ciencias Silvoagropecuarias
y Veterinaria, INIA La Platina

Nelly Nova L.

Ingeniera en Biotecnología Molecular, Asesora Privada

Comité editor técnico

Ivette Acuña B. Ingeniero Agrónomo, Ph.D. INIA Remehue, iacuna@inia.cl

Bruno Defilippi B. Ingeniero Agrónomo, Ph.D. INIA La Platina, bdefilip@inia.cl

Carol Krausz B. Ingeniera Agrónoma, Mag. U. de la Serena, ckrausz@userena.cl

Soledad Sánchez T. Ingeniera Agrónoma, Dra. INIA La Platina, soledad.sanchez@inia.cl

Paz Millas O. Ingeniero Agrónomo, Dra. INIA Quilamapu, pmillas@inia.cl

Claudio Salas F. Ingeniero Agrónomo, Dr. INIA Remehue, claudio.salas@inia.cl

Cecilia Peppi A. Ingeniero Agrónomo, Ph.D. INIA La Platina, cecilia.peppi@inia.cl

Nicolás Verdugo V. Ingeniero Agrónomo, Dr. INIA Intihuasi, nicolas.verdugo@inia.cl

Revisión bibliográfica

Yoan Baez T. Bibliotecóloga, yoan.baez@inia.cl

Revisión de textos

María Jesús Espinoza G. Periodista INIA La Platina, mariajesus.espinoza@inia.cl

Director Regional INIA La Platina

Bruno Defilippi B. Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

Colección Libros INIA N° 46

Cita bibliográfica correcta

Madariaga, M. & Nova, N. (Ed). (2024). Virus que afectan el cultivo de la vid en Chile.
Descripción, diagnóstico y estrategias de control. Colección Libros INIA N° 46. Instituto
de Investigaciones Agropecuarias.

ISSN 0717-4829

Inscripción registro de propiedad intelectual N° 2025-A-3152

Prohibida la reproducción total o parcial de este libro, sin la autorización de las editoras o
del Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

© 2024. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación
INIA La Platina, Avenida Santa Rosa 11610, La Pintana, Santiago. Región Metropolitana.
Teléfono: 56-225779102.

Diseño y diagramación: Jorge Berríos V. Diseñador Gráfico
Publicación formato digital

Santiago, Chile, 2024

Autores de capítulos



Mónica Madariaga Villarroel

Licenciada en Biología, Dra., INIA La Platina
mmadariaga@inia.cl

Licenciada en Biología por la Universidad de Concepción y Doctora en Ciencias Silvoagropecuarias por la Universidad de Chile, cuenta con más de 32 años de experiencia al servicio de la agricultura, desempeñándose en el área de virología vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), en el Centro Regional INIA La Platina, ubicado en Santiago, Región Metropolitana.

Es miembro activo de la Sociedad Chilena de Fitopatología, donde ejerció como secretaria durante los períodos 2016-2017 y 2017-2018.

Como investigadora responsable del área de virología de INIA ha dirigido y colaborado en numerosos proyectos de investigación, cuyos resultados se han reflejado en publicaciones científicas, libros y documentos de divulgación.

Su labor investigativa se ha centrado en la identificación de nuevas enfermedades de origen viral, el estudio de su epidemiología y el desarrollo de estrategias de control, con el objetivo de generar un impacto económico positivo en la agricultura. Paralelamente, ha impulsado la creación de una plataforma de servicios tecnológicos destinada a apoyar a los productores agrícolas, fortaleciendo así el vínculo entre la investigación y la práctica agrícola.



Nelly Nova Lobos

Ingeniera en Biotecnología Molecular. Asesora Privada
nelly.sofia.nova@gmail.com

Ingeniera en Biotecnología Molecular y Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas por la Universidad de Chile, cuenta con más de una década de experiencia en investigación en el área de la biología vegetal.

Ha formado parte de grupos de trabajo en prestigiosas instituciones, como la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), específicamente en el Centro Regional INIA La Platina.

A lo largo de su carrera profesional, ha participado en destacados proyectos de investigación científica y es autora de numerosas publicaciones científicas y técnicas. Además, se ha desempeñado como asesora externa, especializándose en la edición de publicaciones científicas y técnicas, aportando así al fortalecimiento de la comunicación científica.



Carol Krausz Barrientos

Ingeniera Agrónoma, Mag^o., U. de la Serena
ckrausz@userena.cl

Ingeniera Agrónoma titulada de la Universidad Austral de Chile. Académica e Investigadora del Departamento de Agronomía de la Universidad de La Serena, especializada en el área fitosanitaria y gestión de la calidad, con énfasis en Nematología Agrícola. Actualmente, es la encargada del Laboratorio de Fitosanidad de la misma institución.

Con 30 años de experiencia en nematología en Chile, ha liderado proyectos de investigación y tesis de pregrado enfocados en nemátodos de importancia agrícola.

Asimismo, ha participado en la validación de nematicidas, bio-nematicidas y bioestimulantes para diversas empresas químicas, contribuyendo a la búsqueda de alternativas de control dentro del manejo integrado, con el objetivo de apoyar a los agricultores y empresas agrícolas hacia una producción más sustentable e inocua. Además, mediante la prestación de servicios, realiza análisis de muestras vegetales y de suelo para extracción y cuantificación de nemátodos fitoparásitos de todas las zonas agrícolas de Chile.



María Cecilia Peppi Aronowsky

Ingeniero Agrónomo, Ph.D., INIA La Platina
cecilia.peppi@inia.cl

Ingeniera Agrónoma de la Pontificia Universidad Católica de Chile, con un M.Sc. en Horticulture and Agronomy y un Ph.D. en Plant Biology de la University of California, Davis.

Se ha especializado en fisiología aplicada en vides de mesa y vides para vinificación, con énfasis en el uso de reguladores de crecimiento y en el impacto del ambiente sobre el desarrollo de la uva y la síntesis de metabolitos secundarios, como las antocianinas.

Entre sus principales áreas de interés se encuentran el uso de portainjertos, el manejo del follaje y los efectos sobre la calidad de la fruta. Su enfoque integral combina aspectos técnicos y económicos, optimizando el manejo en campo para maximizar los resultados.

Ha liderado y participado en destacados proyectos de investigación científica y en convenios tecnológicos con productores del sector de la uva de mesa. Actualmente, dirige el Programa de Mejoramiento Genético de Vides de Mesa de INIA, además de desarrollar directrices de manejo agronómico para las nuevas variedades generadas en dicho programa.



Isabel Ramírez Abarca

Ingeniera en Biotecnología Molecular, INIA La Platina
isabel.ramirez@inia.cl

Ingeniera en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile, con más de una década dedicada a la investigación y diagnóstico de patógenos vegetales en el Laboratorio de Virología del Centro Regional de Investigación INIA La Platina. Como responsable del área de biología molecular, ha liderado el desarrollo e implementación de herramientas moleculares avanzadas para la detección temprana de enfermedades virales y el análisis de su impacto en la producción agrícola.

Su experiencia científica ha sido clave para la creación de tecnologías destinadas a obtener cultivos libres de enfermedades virales. Los resultados de sus investigaciones, publicados en diversas revistas científicas, han contribuido significativamente al diseño de nuevas estrategias de manejo y control de enfermedades virales en cultivos agrícolas.



Claudio Salas Figueroa

Ingeniero Agrónomo, Dr., INIA Remehue
Claudio.salas@inia.cl

Ingeniero Agrónomo con grado de Doctor en Entomología Agrícola y Diplomado en Agroecología de Zonas Áridas, cuenta con más 20 años de experiencia como investigador en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), desempeñándose en los centros regionales INIA Intihuasi e INIA Remehue.

Desde el año 2022, ha asumido cargos administrativos, ejerciendo como Director y Subdirector de Investigación de los centros regionales mencionados, respectivamente.

Es miembro activo de la International Organización for Biological Control (IOBC); Red colaborativa de investigación de enfermedades en trabajadores agrícolas (Riplag) y de la Sociedad Chilena de Entomología (Registro ST048SCHE), institución que presidió durante los periodos 2011-2012 y 2012-2013.

A lo largo de su trayectoria, ha sido autor de numerosos artículos divulgativos y científicos, además de capítulos de libros nacionales e internacionales relacionados con el ámbito del Manejo Integrado de Plagas, con énfasis en control biológico por conservación. Ha participado en más de veinte proyectos de investigación como investigador principal o colaborador.



Karina Sepúlveda Gajardo

Ingeniera Agrícola, INIA La Platina
karina.sepulveda@inia.cl

Ingeniera Agrícola del Instituto Profesional DUOC, con casi una década de experiencia en el Laboratorio de Virología de INIA La Platina. Como encargada del área de cultivo *in vitro*, se ha especializado en el saneamiento de plantas infectadas con virus, destacándose en la aplicación de técnicas tradicionales como el cultivo de meristemos y la termoterapia, además de implementar métodos más avanzados, como la crioterapia y la microinjertación.

Ha participado como coautora en diversas publicaciones científicas y divulgativas que han contribuido a mejorar la sostenibilidad de diversos cultivos agrícolas.



Nancy Vitta Palacios

Ingeniera Agrónoma, Mag., INIA La Platina
nvitta@inia.cl

Ingeniera Agrónoma y Magíster en Ciencias de la Agricultura por la Pontificia Universidad Católica de Chile, con más de dos décadas de experiencia en investigación en el Laboratorio de Entomología de INIA La Platina.

Su trabajo se ha enfocado en el desarrollo e implementación de herramientas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), orientadas a la detección temprana de insectos plaga agrícolas, urbano-rurales y ornamentales, con énfasis en mitigar su impacto negativo tanto en la producción agrícola como en el ámbito social.

Su trayectoria científica ha sido clave para la transferencia de conocimientos al sector productivo y académico. Además, los resultados de sus investigaciones han sido publicados en diversas plataformas, contribuyendo al diseño de estrategias eficaces para el manejo y control de plagas.

Su aporte al conocimiento ha sido reconocido por el Colegio de Ingenieros Agrónomos de Chile A.G., pues el Honorable Consejo General de la Orden la nominó para recibir el Premio Especial "Francisco Rojas" por su relevante desempeño en el servicio público, correspondiente al año 2019.

Índice

Prólogo	11
Capítulo 1	
El cultivo de la vid en Chile	15
1.1. Reseña histórica	15
1.2. Situación actual	16
1.2.1. Vides de mesa	16
1.2.2. Vides para vinificación	18
1.2.3. Manejos vitícolas	18
1.3. Bibliografía	19
Capítulo 2	
Características de los virus que afectan el cultivo de la vid	23
2.1. Familia Secoviridae	24
2.1.1. Género <i>Nepovirus</i>	25
2.2. Familia <i>Closteroviridae</i>	28
2.2.1. Género <i>Closterovirus</i>	30
2.2.2. Género <i>Ampelovirus</i>	31
2.2.3. Género <i>Velarivirus</i>	31
2.3. Familia <i>Betaflexiviridae</i>	31
2.3.1. Género <i>Vitivirus</i>	33
2.3.2. Género <i>Foveavirus</i>	33
2.3.3. Género <i>Trichovirus</i>	33
2.4. Familia <i>Tymoviridae</i>	34
2.4.1. Género <i>Maculavirus</i>	35
2.4.2. Género <i>Marafivirus</i>	35
2.5. Bibliografía	36
Capítulo 3	
Enfermedades causadas por virus que afectan el cultivo de la vid en Chile	43
3.1. Descripción de enfermedades virales en vides presentes en Chile	45
3.1.1. Degeneración infecciosa y declinamiento de la vid	46
3.1.2. Enrollamiento de la hoja de la vid	58
3.1.3. Complejo rugoso de la madera	62
3.1.4. Fleck	63
3.1.5. Enfermedades emergentes presentes en Chile	64
3.2. Prevalencia de los principales virus que afectan la vid	64
3.3. Bibliografía	66

Capítulo 4

Diagnóstico de virus en vides	71
4.1. Indexación biológica	71
4.1.1. Indexado con plantas herbáceas	71
4.1.2. Indexado con plantas leñosas	72
4.2. Métodos serológicos	74
4.2.1. DAS-ELISA	74
4.2.2. TAS-ELISA	75
4.2.3. ELISA indirecto	76
4.3. Métodos moleculares	77
4.3.1. PCR	77
4.3.2. LAMP	83
4.3.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)	85
4.4. Toma de muestras	85
4.5. Bibliografía	86

Capítulo 5

Virus transmitidos por coccoídeos (Insecta: Hemiptera)	95
5.1. Coccoídeos como vectores y mecanismos de transmisión de virus	95
5.2. Ciclo biológico de coccoídeos, hábitos alimenticios y comportamiento	97
5.3. Factores asociados a la transmisión de virus	98
5.4. Especies de coccoídeos vectores	99
5.5. Estrategias de gestión de coccoídeos en vides	103
5.6. Bibliografía	106

Capítulo 6

Nemátodos transmisores de virus en vid	111
6.1. Características generales de los nemátodos fitoparásitos transmisores de virus: ciclo de vida, comportamiento y hábitos alimenticios	112
6.2. Nemátodos como vectores de virus en vid y mecanismos de transmisión	113
6.3. Especies de nemátodos vectores de virus en la vid	114
6.3.1. <i>Xiphinema</i> spp. (Nemátodos Daga)	114
6.3.2. <i>Longidorus</i> spp. y <i>Paralongidorus</i> spp.	116
6.3.3. <i>Trichodorus</i> spp.	117
6.4. Estrategias de manejo de nemátodos en vides	117
6.4.1. Manejos preventivos	118
6.4.2. Manejos culturales	118
6.4.3. Manejo a través de resistencia genética	119
6.4.4. Manejo biológico	120
6.4.5. Manejo químico	121
6.5. Bibliografía	122

Capítulo 7

Saneamiento: una metodología para el control de enfermedades causadas

por virus en la vid	127
7.1. Control de enfermedades causadas por virus	127
7.2. Técnicas de laboratorio para saneamiento	128
7.2.1. Termoterapia	128
7.2.2. Cultivo de meristemos	129
7.2.3. Cultivo de ápices caulinares	129
7.2.4. Quimioterapia	129
7.2.5. Crioterapia	130
7.2.6. Electroterapia	130
7.2.7. Embriogénesis somática	130
7.3. Eficiencia del proceso de saneamiento de virus en plantas de vid	130
7.4. Descripción de un protocolo de saneamiento para vides	131
7.4.1. Cultivo <i>in vitro</i>	133
7.4.2. Multiplicación	133
7.4.3. Termoterapia	133
7.4.4. Cultivo de meristemo y de ápices caulinares	136
7.4.5. Aclimatación de plántulas	137
7.5. Bibliografía	139

Capítulo 8

Viroides y fitoplasmas (Virus-like) que afectan el cultivo de la vid	143
8.1. Viroides	143
8.1.1. Viroides que afectan el cultivo de la vid en Chile	148
8.2. Fitoplasmas	150
8.2.1. Clasificación taxonómica y diagnóstico	153
8.2.2. Fitoplasmas que afectan el cultivo de la vid en Chile	154
8.3. Bibliografía	156

Glosario	159
-----------------	-----



Prólogo

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un frutal de gran importancia económica a nivel mundial, tanto por su producción como uva de mesa y uso en la vinificación. En Chile, este cultivo ha estado presente desde la llegada de los conquistadores españoles. Su fruto se consume principalmente en estado fresco, lo que representa un importante ingreso de divisas para el país gracias a su exportación a numerosos mercados internacionales. Además, es la base de la industria vitivinícola chilena, reconocida a nivel mundial.

Al igual que todos los organismos vivos, la vid es susceptible a diversas enfermedades causadas por distintos agentes patógenos. Entre ellos, los virus que destacan por su impacto negativo en el cultivo, ya que afectan la calidad de la fruta y reducen sus rendimientos.

Según datos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 2023), la superficie de vides en Chile alcanza las 178.000 hectáreas, de las cuales un 22 % corresponde a vides de mesa, el 73 % a vides para vinificación y el 5 % a vides pisqueras. Esta vasta superficie convierte a la vid en el principal frutal del país, aunque también la expone de manera constante a diversas amenazas biológicas.

Como es sabido, los virus no tienen un tratamiento curativo; una vez que una planta es infectada, permanece afectada de forma permanente. Por ello, es fundamental contar con un conocimiento actualizado y continuo sobre los virus que afectan a la vid, así como sobre su manejo. Este conocimiento es clave tanto para viveros como para plantaciones comerciales.

Investigadores del Centro Regional INIA La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) han dedicado muchos años al estudio de esta especie frutal, abordando diversas disciplinas relacionadas con el conocimiento y manejo de este cultivo. Los resultados de estas investigaciones se han plasmado en varios documentos técnicos publicados a lo largo de los años.

En este libro en particular encontrarán una versión amena y actualizada de las enfermedades causadas por virus que afectan el cultivo de la vid en Chile y su manejo. Este tema ha sido magníficamente abordado por la Dra. Mónica Madariaga, investigadora en virología con vasta experiencia en la materia. En esta obra, la Dra. Madariaga ha plasmado sus conocimientos y los avances de sus investigaciones. Además, incluye contribuciones de varios otros investigadores, autores y coautores de los diferentes capítulos.

Este documento representa un nuevo aporte de INIA Chile a la agricultura nacional, ofreciendo una actualización y un análisis profundo de temas tan importantes como las enfermedades virales, que muchas veces pueden pasar desapercibidas. Estoy segura de que este libro será muy bien recibido por la comunidad agrícola, incluyendo a productores, exportadores, técnicos, asesores, académicos, estudiantes y otros actores clave de la cadena productiva. Todo ello enmarcado en una visión integral y actualizada del cultivo de la vid en Chile.

Los diferentes capítulos de este libro han sido cuidadosamente desarrollados y están ilustrados con imágenes, figuras y cuadros relacionados con los diversos temas. Este enfoque gráfico facilitará el aprendizaje de los lectores, ya que incluye explicaciones detalladas sobre sintomatologías, metodologías de diagnóstico y otros aspectos de interés para profundizar sus conocimientos.

La publicación comprende ocho capítulos, escritos por profesionales reconocidos y con amplia experiencia en las especialidades de virología, entomología, nematología y viticultura. A lo largo de sus páginas, se abordan temas como reseña del cultivo de la vid y su situación actual en el país, las variedades más actuales comunes y sus manejos, así como la descripción de los virus que causan enfermedades presentes en Chile.

También se incluyen los síntomas característicos, los mecanismos de transmisión, los agentes vectores, las técnicas de diagnóstico y las estrategias de saneamiento para materiales “élite”.

La información contenida en estas páginas permitirá a productores y técnicos tomar decisiones oportunas y eficientes, enfocadas en el control preventivo y reconocimiento de virosis en sus viñedos.

Cada uno de los autores y coautores han plasmado en este texto el valioso aporte de sus conocimientos adquiridos durante su formación profesional y experiencia como investigadores de INIA, siempre vinculados estrechamente a los productores.

Con esta obra se espera contribuir al desarrollo de una viticultura nacional más sostenible y competitiva, que permita posicionar la fruta fresca y los vinos chilenos en los exigentes mercados internacionales.

Paulina Sepúlveda Ramírez
Ingeniero Agrónomo, M.Sc.
Especialista en fitopatología
Ex Directora Regional INIA La Platina

El cultivo de la vid en Chile

Capítulo

1



El cultivo de la vid en Chile

M. Cecilia Peppi A.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.

Las vides corresponden al género *Vitis*, y aunque existen numerosas especies, la vid europea o *Vitis vinifera* —por las características de su fruta— es por lejos la más ampliamente cultivada en el mundo, siendo utilizada para la producción de vino, fruta fresca y proceso (pasas, jugos, entre otros). A nivel global, existen alrededor de 7,2 millones de hectáreas (OIV, 2024) y en Chile actualmente, hay 134.000 ha destinadas a la producción de uvas para vinificar y 30.000 ha para fruta fresca o uva de mesa. En el presente, es cultivada en distintos climas y suelos, y destinada a diversos objetivos productivos, con distintas variedades que por sus características resultan adecuadas para cada caso.

1.1. Reseña histórica

La *Vitis vinifera* L., especie sobre la cual se basa la producción nacional tanto de uva de mesa como de uvas para vinificación, fue introducida a Chile por los conquistadores españoles en el siglo XVI. Inicialmente, el objetivo fue la producción de vino para celebraciones religiosas; sin embargo, con el tiempo comenzó a utilizarse con distintos propósitos, incluyendo el consumo de fruta fresca. Dadas las características edafoclimáticas de Chile, la vid se expandió rápidamente por gran parte del territorio nacional.

Durante el período colonial, comenzaron a producirse con uva distintos vinos y bebidas alcohólicas. Además, ya se contaba con variedades para el consumo fresco, las cuales distan mucho de lo que hoy consideramos característico de una uva de mesa, pero que proporcionaban una alternativa de fruta para la población. Existieron algunos viñedos dedicados a la producción local de fruta y algo de exportación de uvas a países vecinos, sobre la base de variedades como Almería, Moscatel Rosada y Ribier. Posteriormente, Manuel Ruano, empresario español que ya había comenzado el cultivo de vides de mesa en Mendoza, se asocia con el agricultor Genaro Prieto y familia, para establecer viñedos de uva de mesa en Chile a una escala más comercial. Con este propósito, a partir de 1930, traen desde el otro lado de la cordillera a Llay-Llay, en la Región de Valparaíso, a cuatro familias de inmigrantes italianos, especialistas en el cultivo de la uva de mesa, quienes instalan los primeros parronales españoles, el sistema de conducción que por años ha dominado el paisaje de la uva de mesa chilena. Pocos años después comenzaría la exportación de uvas desde Llay-Llay —vía puerto de Valparaíso— hacia Estados Unidos. A fines de la década del 40, la familia Prohens comienza la producción de uva de mesa en el valle de Copiapó, en la Región de Atacama, vislumbrándose ya entonces el papel de esta zona en la industria de la uva nacional.

La década de 1980 comenzó con un crecimiento importante en la superficie cultivada de uva de mesa chilena, pasando de 4.500 hectáreas a mediados de 1970 a 13.500 ha en 1980 (ODEPA, censo 1975-1987), lo que significó un incremento importante de la uva de mesa en la superficie frutícola nacional total. Desde esta década, la expansión continuó aceleradamente, triplicando el área utilizada para vides

para el consumo fresco, representando casi el 30 % del área frutícola en 1995 (ODEPA, censo 1990-2004). Durante los siguientes años, la superficie destinada a uva de mesa se mantuvo relativamente estable, con estimaciones que alcanzaron a 53.000 ha en la primera década del siglo XXI. Sin embargo, desde esta fecha se ha observado un retroceso, alcanzando en el último catastro frutícola cerca de 40.000 ha (CIREN-ODEPA, 2023), aunque informalmente la industria considera que hoy la uva de mesa del país está bajo las 30.000 ha.

Paralelamente, la industria del vino también fue desarrollándose. Entre los conquistadores españoles fue común contar con viñedos propios, sobre todo de la variedad País, para la producción de vinos, los que se consumían mayoritariamente en forma local. La vitivinicultura se mantuvo bajo este esquema hasta mediados del siglo XIX, cuando el empresario Silvestre Ochagavía da un impulso a la industria con la importación de variedades francesas como Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot, Sauvignon blanc, Chardonnay, además de las compras de maquinaria e implementos que modernizaron la industria de la época. Varias bodegas nacionales se establecieron en ese período, y se mantienen exitosamente hasta hoy.

La aparición de la Filoxera en Europa a fines del siglo XIX significó una diferenciación para Chile, pues el país ya se consideraba vitícola y no fue afectado por esta plaga, lo que permitió mantener los viñedos y la actividad de las bodegas. Sin embargo, los años siguientes la producción nacional de vino no logró mantenerse, y por razones principalmente económicas, la superficie vitícola y la elaboración de vinos tuvo una fuerte retracción (Müller, 2004). Además, a principios del siglo XX la situación tributaria y normativas legales mantuvieron la producción de vinos estancada (Biblioteca Nacional, 2015).

El siglo siguiente fue particularmente difícil para los viñateros. Distintas crisis afectaron la rentabilidad y la superficie disminuyó hasta la última década, cuando se comienza a notar en forma clara la reactivación del rubro, de la mano de las exportaciones y reconocimientos internacionales de la calidad del vino chileno (Biblioteca Nacional, 2015).

El nuevo impulso a la actividad vitivinícola se refleja en la superficie plantada, que aumenta considerablemente. Desde 1990, las 65.000 ha (ODEPA, 2017) llegan a 129.000 reportadas el 2023 (SAG, 2023). A esto se suman 9.000 ha de vides pisqueras en las regiones de Atacama y Coquimbo. Los vinos de Chile son reconocidos mundialmente y forman parte de la identidad y patrimonio nacional.

1.2. Situación actual

En el país existen hoy 178.000 ha con vides, 22 % corresponden a vides de mesa, 73 % vides para vinificación y 5 % pisqueras (SAG, 2023; CIREN-ODEPA, 2023).

1.2.1. Vides de mesa

De las 373.122,57 ha destinadas a la producción frutícola nacional, casi el 11 % (39.930,58 ha) son uvas de mesa (CIREN-ODEPA 2023), ubicadas entre las Región de Atacama y la parte norte de la Región del Maule, aunque concentradas principalmente en las regiones de O'Higgins, Valparaíso y Coquimbo. El principal objetivo de la producción es la exportación, variando los mercados a lo largo de los años según las variedades y el contexto económico mundial, aunque siempre con un importante foco en Norteamérica. La industria de la uva de mesa representa además una importante fuente laboral a nivel local y sus exportaciones han generado importantes ingresos al país. Por varios años, Chile se posicionó como el principal exportador de uva de mesa del mundo, llegando a inicios de la segunda década del siglo XXI a exportar más de 100 millones de cajas, equivalentes a más de 1.400 millones de dólares FOB (ODEPA, 2024). Debido a diversos factores, la industria vitícola ha sufrido una fuerte contracción

las últimas temporadas, observándose en 2023 una exportación cercana a 60 millones de cajas, con un valor FOB menor a los 800 millones de dólares, posicionando a nuestro país en el segundo lugar como exportador mundial (iQonsulting, 2023). La temporada 2024 presentó una variación en la tendencia; se exportaron casi 65 millones de cajas, el valor FOB superó los 1.000 millones dólares y se recuperó el liderazgo exportador, al menos temporalmente (iQonsulting, 2024).

Problemas climáticos, dificultades logísticas para los envíos, problemas de precio en los mercados, mayor competencia en la oferta, mayores costos de producción y otros factores han influido fuertemente en los resultados productivos y comerciales de las últimas temporadas. Situaciones puntuales, asociadas sobre todo a fenómenos climáticos, favorecieron los resultados de la temporada 2024, aunque se espera que las condiciones no se repitan en el corto plazo. Sin embargo, Chile sigue siendo un referente mundial en el rubro y la uva de mesa continúa siendo una actividad significativa para el país. Además, justamente en tiempos de crisis es cuando esta industria se renueva y adapta para responder a nuevos desafíos, donde los rendimientos, calidad y condición de la fruta deben ser optimizados desde todos los ángulos.

En sus inicios, la industria se sustentaba en variedades semilladas, pero hoy esto ha evolucionado y la superficie nacional de variedades con semilla es limitada y se reduce aún más cada temporada (iQonsulting, 2023). Básicamente, la única variedad semillada aún con cierta presencia en el mercado es Red Globe, pero de las cerca de 11.000 ha que llegó a ocupar (CIREN-ODEPA 2014 y 2015) hoy quedan menos de 5.500 ha (CIREN-ODEPA 2023). Adicionalmente, no solo la industria ha cambiado a variedades apirenas (sin semilla), sino que en la última década ha existido una fuerte renovación varietal, que ha desplazado las cinco variedades que por mucho tiempo fueron consideradas tradicionales (Superior Seedless, Flame Seedless, Thompson Seedless, Crimson Seedless y Red Globe) por un nuevo grupo de más de veinte variedades que continúan ampliando su superficie y producción (Figura 1.1).

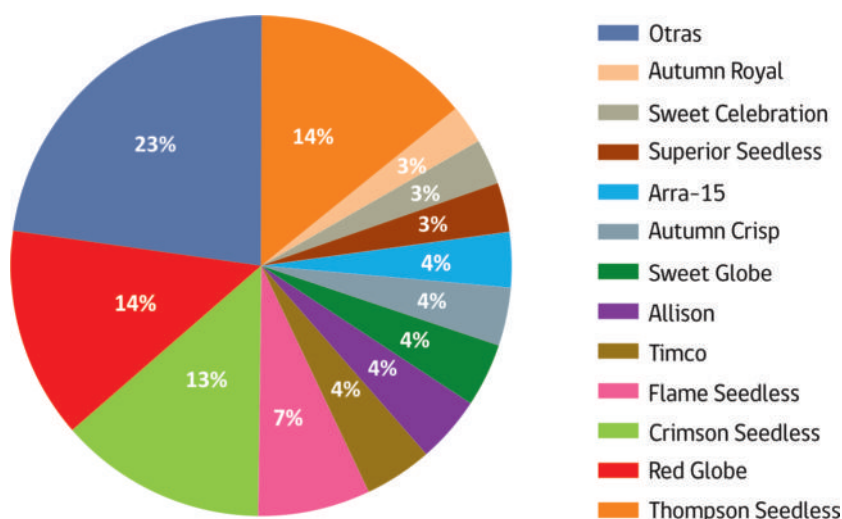


Figura 1.1. Superficie varietal de vides de mesa en Chile, 2023 (figura creada con datos Catastro CIREN-ODEPA 2023).

La oferta varietal de distintos programas de mejoramiento genético ha llevado a un fuerte dinamismo. Cada año nuevas variedades comienzan a ser utilizadas por los productores y otras van siendo descartadas, lo que ha influido de forma importante en cómo se enfrenta técnicamente la producción. Del total exportado, más de la mitad correspondió a variedades nuevas y la proporción continúa creciendo cada año. Este incremento no solo se explica por los cambios en superficie, sino también por la considerable mayor productividad de las nuevas variedades.

1.2.2. Vides para vinificación

Por otro lado, en el país hoy existen 124.436 ha de vides destinadas a la producción de vinos y 9.232 ha para pisco (SAG, 2023). La producción de vinos proviene de vides plantadas desde Arica a la Región de Aysén, pero la región vitivinícola por excelencia es el Maule, con 37.264 ha de tintos y casi 14.000 ha con vides de cepajes blancos (SAG, 2023). De las vides para vino, la mayoría corresponde a variedades tintas, y solo Cabernet Sauvignon representa casi un tercio de la superficie nacional. De las más de 50 variedades tintas, las más importantes por presencia, además de Cabernet Sauvignon, son Merlot, País, Carménère, Syrah, Pinot noir. Entre las variedades blancas destacan por superficie Sauvignon blanc y Chardonnay, pero existen otras 40 variedades que contribuyen a la creciente diversidad de la oferta enológica nacional. Chile hoy, con 11 millones de litros, es el quinto productor de vinos del mundo y exporta 6,8 millones de litros, lo que posiciona al país como el cuarto exportador de vinos del mundo (OIV, 2024).

La superficie pisquera está mayoritariamente en la Región de Coquimbo, a la que se suman 560 ha ubicadas en valles de la Región de Atacama. La variedad más plantada es Pedro Jiménez, seguida de Moscatel de Austria y Moscatel Rosada.

1.2.3. Manejos vitícolas

Históricamente, el cultivo de vides en Chile fue con vides francas, sobre su propio pie. La ausencia de Filoxera en el país permitió el desarrollo de la viticultura sin la utilización de portainjertos, sin embargo, la intensidad misma del cultivo, las exigencias productivas y las limitantes edáficas transformaron la industria vitícola, y hoy las nuevas plantaciones son prácticamente todas con plantas injertadas. En este nuevo sistema, la sanidad de las plantas, y en particular su estatus viral, resultan críticos. El uso de portainjertos en Chile comenzó con vides de mesa, con el uso de Harmony y Freedom, los cuales son buenas opciones para producir en suelos infestados con nemátodos, y también se utilizó Ramsey, que permite producir bajo condiciones de salinidad. Paulatinamente se fue ampliando el abanico de posibilidades y hoy los productores tienen al menos ocho alternativas de portainjertos adecuados para la producción de uvas de mesa, siendo el más popular P-1103 (AGV, 2022). En los viñedos chilenos destinados a la producción de vinos, el uso de plantas injertadas comenzó más tarde, pero ya se ha adoptado en forma generalizada el uso de portainjertos y las nuevas plantaciones están sobre P-1103, SO4, Kober 5BB, 101-14 Mgt, entre otros. El uso de plantas injertadas en la vitivinicultura ha permitido controlar el vigor, tener manejos alternativos para nemátodos, la adaptación a distintas condiciones hídricas y la posibilidad de cultivar en distintos contextos edafoclimáticos.

Además de las variedades y el cambio de cultivo de vides francas a injertadas, la producción en Chile ha ido evolucionando también en sistemas de conducción y distancias de plantación. Inicialmente, la uva de mesa se estableció en forma casi exclusiva en parronal español, con distancias de plantación de 4 x 4 m, que luego pasaron a ser más cercanas: 3,5 x 3,5 m, 3 x 3 m, 3,2 x 2 m y 3 x 1,8 m. En la actualidad, parte importante de la superficie ya no utiliza sistemas de canopia horizontal como el parronal y ha adoptado sistemas tipo Gable, muchos con ángulos abiertos (Open Gable), que por la altura de ubicación de los racimos facilitan muchas de las labores de campo. En viñedos destinados a vinificación, la espaldera ha sido y sigue siendo el sistema de conducción predominante, salvo la conducción en cabeza en zonas de secano y algunos parronales distribuidos en distintas regiones. Las distancias de plantación de las espalderas también han sufrido modificaciones, aunque más relacionadas a los terrenos, pendientes, clima, vigor y manejo de las plantas. Además, las espalderas han permitido la mecanización de las vendimias y las podas.

Otro cambio importante ha sido el riego. Hoy, salvo algunos viñedos de secano, las plantaciones se basan en el uso de riego tecnificado, principalmente riego por goteo, no sólo por la eficiencia hídrica, sino que también responde a un sistema que facilita la optimización del manejo de las plantas.

Para finalizar, la viticultura de Chile y el mundo ha evolucionado, y nuevos aspectos técnicos han pasado a ser críticos. Así, el manejo de los huertos de uva de mesa recientemente ha tenido, y continúa teniendo, un desarrollo enfocado en la simplificación de labores. El éxito del sistema se basa en la optimización productiva y en la calidad de la fruta, con un control del costo de los manejos involucrados. En el caso de la vitivinicultura, la incorporación de nuevas zonas y la mecanización, la plantación con variedades de distinto origen, han llevado a nuevos sistemas que buscan expresar una identidad de vinos diversa y especial. En este escenario, resulta crítico contar desde el inicio con excelentes plantas, tanto fisiológica como sanitariamente, que faciliten una alta productividad y calidad. Los virus que pueden afectar a las vides presentan sintomatologías desde problemas de cuaja o calidad de la fruta hasta la muerte de plantas, por lo que el diagnóstico y los manejos preventivos son una herramienta fundamental.

1.3. Bibliografía

Asociación de Viveros de Chile [AGV]. (2022). Anuario de Viveros 2022. Plantas Frutales y Vides Comercializadas en Chile 2017-2021 [Online]. <https://chilealimentos.com/wp-content/uploads/2022/09/anuario-viveros-2022-agv.pdf>

Base de datos OIV. (s. f.). <https://www.oiv.int/es/what-we-do/data-discovery-report?oiv>

Ediciones Biblioteca Nacional. (2015). Patrimonio vitivinícola: aproximaciones a la cultura del vino en Chile [Online]. <https://www.bibliotecanacionaldigital.gob.cl/visor/BND:127450>

iQonsulting. (2023). Anuario 2023 Mercado internacional de uva de mesa. En <https://iqonsulting.com/yb/>. Recuperado 1 de abril de 2024, de <https://www.calameo.com/read/007154470c6d553137221>

iQonsulting. (2024). Anuario 2024 Mercado internacional de uva de mesa. En <https://iqonsulting.com/yb/>. Recuperado 1 de abril de 2024, de <https://www.calameo.com/read/007154470e0bc4544e8f2>

Müller, K. (2004). Chile vitivinícola en pocas palabras. ACE: Revista de Enología, Nº 52, 1697-4123

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias [ODEPA] & Centro de Información de Recursos Naturales [CIREN]. (2014). Catastro frutícola Principales resultados región metropolitana. Recuperado 15 de marzo de 2024, de <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/8954/catastroFruticolaRegionMetropolitana2014.pdf>

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias [ODEPA] & Centro de Información de Recursos Naturales [ODEPA]. (2015). Catastro frutícola principales resultados región de O'Higgins. Recuperado 15 de marzo de 2024, de <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71132/Catastro-Fruticola-VI-Region-O'Higgins-2015.pdf>

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias [ODEPA]. (2017). Superficie y producción de vides para vinificación, de mesa y pisqueras [Conjunto de datos; Online]. https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2017/02/Vides_superficie_y_produccion%CC%81n.xls

Oficina de Planificación Agrícola (Odepa) (2021-08-02) Chile: estadísticas agropecuarias 1975 – 1987. [en línea]. (Consultado: 03 abril 2024)

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa) (2021-09-03) Compendio estadístico silvoagropecuario 1990 – 2004. Consultado: 03 abril 2024)

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias [ODEPA] & Centro de Información de Recursos Naturales [CIREN]. (2023). Catastro frutícola Principales resultados región metropolitana. Recuperado 27 de marzo de 2024, de <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2023/11/RegionMetropolitana-0911.pdf>

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – Odepa. (2024). Comercio exterior – ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/comercio-exterior>

SAG, 2023. Catastro vitivinícola año 2023. Informe ejecutivo. <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/73540/InformeEjecutivoCatastro2023.pdf>

Características de los virus que afectan el cultivo de la vid

Capítulo

2



Características de los virus que afectan el cultivo de la vid

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.

Nelly Nova L.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Los virus son partículas infecciosas con una estructura física muy simple, conformada por un ácido nucleico que puede ser Ácido desoxirribonucleico (ADN) o Ácido ribonucleico (ARN) que contiene la información genética. Cabe destacar que aproximadamente el 90 % de los virus vegetales están conformados por ARN. Esta información genética está protegida por una cubierta proteica o cápside y en alguno de ellos, además, puede existir una membrana lipídica o envoltura vírica. Todo ello genera viriones de diversas formas y tamaños.

Esta conformación tan simple lleva a los virus a tener comportamiento de parásitos intracelulares obligados, es decir, no tienen metabolismo propio, por lo tanto, necesitan utilizar la maquinaria celular de su hospedero para poder replicar sus partículas y completar el proceso infeccioso. Este proceso se inicia cuando el virus ingresa a una célula y utiliza los componentes celulares del hospedero para replicar y traducir su genoma, produciendo varias partículas virales (o viriones) nuevas. A continuación, el virus comienza a moverse de una célula a otra hasta llegar al sistema vascular de la planta, desde donde puede distribuirse sistémicamente a todo el organismo, pudiendo provocar un desbalance estructural y bioquímico en el hospedero, lo que se manifiesta en síntomas que pueden afectar el desarrollo de la planta, su follaje o sus frutos, siendo esta la causa de los graves impactos económicos que estos patógenos generan.

El virus asegura la continuidad de su proceso infeccioso entre hospederos mediante el movimiento a corta y larga distancia con una estrategia vertical y otra horizontal. En el primer caso, el virus pasa desde el hospedero infectado hacia su descendencia, como ocurre en la transmisión de virus por semillas y en la propagación vegetativa. En la estrategia horizontal, el virus utiliza vectores, tales como insectos, hongos, ácaros, nemátodos, entre otros, que le permiten infectar un nuevo hospedero sano. Con estas estrategias, el virus asegura su permanencia en una población de plantas, el traspaso a hospederos diferentes, como pueden ser malezas presentes en el huerto y, finalmente, su establecimiento en nuevas zonas geográficas.

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, la viticultura es uno de los principales cultivos a nivel nacional y no está ajeno a las infecciones virales. Actualmente, a nivel mundial se conocen alrededor de 86 especies de virus que afectan este cultivo (Fuchs, 2020), siendo varios de ellos un potencial riesgo para Chile, ya que son los principales responsables de enfermedades devastadoras para la industria vitivinícola, tales como la degeneración infecciosa, el enrollamiento de la hoja, el complejo rugoso de la madera, entre otras, de las cuales se hablará más en profundidad en el siguiente capítulo.

En Chile, la primera asociación entre virus y el cultivo de la vid fue realizada a fines de los años 70 por Cereceda y Auger, 1979. Posteriormente, con el desarrollo de nuevas y poderosas herramientas de detección, el número de especies patógenas descritas ha aumentado progresivamente, con variaciones en sus características y consecuencias económicas.

Hasta la fecha, en Chile se han identificado los virus más importantes presentes en Europa y Estados Unidos, entre ellos: Grapevine fan leaf virus (GFLV) (Cereceda y Auger, 1979), el cual pertenece al género *Nepovirus* y es el causante de la disminución de la productividad y decaimiento de las plantas (Auger *et al.*, 1994); y el complejo de virus Grapevine leafroll virus associated (GLRaV) que comprende seis especies pertenecientes a la familia *Closteroviridae*, pero serológicamente distintas entre sí. En este último, las especies pertenecientes a este complejo de virus se denominan seguido de un número (1,2,3,4,7,13) y en Chile ya se han determinado cinco especies: GLRaV-2, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4 y GLRaV-7 (Arancibia y Auger, 1987; Sánchez y Hepp, 1994; Fiore *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2010a).

En los últimos años, Fiore *et al.* (2008) determinaron la presencia de Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV), Grapevine virus A (GVA) y Grapevine virus B (GVB), todos ellos integrantes de la enfermedad conocida como Complejo rugoso de la madera, afectando los cultivos de vid en Chile, tanto en variedades de uva de mesa como viníferas. Estos mismos autores, también reportaron la presencia de Grapevine fleck virus (GFkV).

Asimismo, se han determinado otros virus cuya estimación de daño comercial es difícil de realizar debido a que su diseminación no es generalizada en el área productiva: Arabis mosaic virus (ArMV) (Herrera y Madariaga, 2001), Grapevine Pinot Gris (GPGV) (Zamorano *et al.*, 2019), que actualmente se encuentra bajo medidas emergenciales de control Resolución 6.405 (SAG, 2023) del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), y una determinación puntual de Grapevine Syrah virus-1 (GSyV-1) (Engel *et al.*, 2010b).

Finalmente, se debe destacar que los virus que infectan vides pertenecen a distintas familias taxonómicas. En este capítulo nos centraremos en los géneros a los cuales pertenecen las especies virales que afectan el cultivo de la vid en Chile (Cuadro 2.1).

2.1. Familia *Secoviridae*

La familia *Secoviridae* está compuesta por nueve géneros, pero tal como se muestra en el Cuadro 2.1, en Chile sólo se han descrito tres especies de virus que pertenecen al género *Nepovirus*, al cual nos referiremos a continuación.

Cuadro 2.1. Clasificación taxonómica de los virus que afectan el cultivo de la vid en Chile y sus vectores.

Familia	Género	Especie	Nombre del virus	Abreviación	Medio de diseminación
<i>Sercoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Nepovirus foliumflabelli</i>	Grapevine fanleaf virus	GFLV	<i>Xiphinema. index</i> (*) Injerto
		<i>Nepovirus arabis</i>	Arabis mosaic virus	ArMV	<i>Xiphinema.diversicaudatum</i> Injerto
		<i>Nepovirus lycopersici</i>	Tomato ringspot virus	ToRSV	<i>Xiphinema. americanum sensu lato</i> (*) Injerto

* Presentes en Chile

Continuación Cuadro 2.1.

Familia	Género	Especie	Nombre del virus	Abreviación	Medio de diseminación
Closteroviridae	Closterovirus	<i>Closterovirus vitis</i>	Grapevine leafroll-associated virus 2	GLRaV-2	Injerto
		<i>Ampelovirus univitis</i>	Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	Injerto <i>Pseudococcus longispinus</i> (*) <i>Planococcus ficus</i> (*) <i>Heliococcus bohemicus</i> <i>Phenacoccus aceris</i> <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> <i>Partenolecanium corni</i> (*)
	Ampelovirus	<i>Ampelovirus trivitis</i>	Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	Injerto <i>Planococcus ficus</i> (*) <i>Pseudococcus longispinus</i> (*) <i>Planococcus citri</i> (*) <i>Pseudococcus viburni</i> (*) <i>Pseudococcus maritimus</i> <i>Heliococcus bohemicus</i> <i>Phenacoccus aceris</i> <i>Pseudococcus comstocki</i> <i>Pulvinaria vitis</i> <i>Pseudococcus calceolariae</i> (*) <i>Ceroplastes rusci</i>
		<i>Ampelovirus tetravitis</i>	Grapevine leafroll-associated virus 4	GLRaV-4	Injerto <i>Pseudococcus longispinus</i> (*) <i>Planococcus ficus</i> (*) <i>Phenacoccus aceris</i> <i>Ceroplastes rusci</i>
	Velarivirus	<i>Velarivirus septemvitis</i>	Grapevine leafroll-associated virus 7	GLRaV-7	Injerto
Betaflexiviridae	Vitivirus	<i>Vitivirus alphavitis</i>	Grapevine virus A	GVA	Injerto <i>Pseudococcus longispinus</i> (*) <i>Planococcus ficus</i> (*) <i>Planococcus citri</i> (*) <i>Pseudococcus affinis</i> (*) <i>Pseudococcus comstocki</i> <i>Phenacoccus aceris</i> <i>Partenolecanium corni</i>
		<i>Vitivirus betavitis</i>	Grapevine virus B	GVB	Injerto <i>Pseudococcus affinis</i> (*) <i>Phenacoccus aceris</i>
	Foveavirus	<i>Foveavirus rupestris</i>	Grapevine rupestris stem pitting associated virus	GRSPaV	Injerto
	Trichovirus	<i>Trichovirus pinovitis</i>	Grapevine Pinot gris virus	GPGV	Injerto <i>Colomerus vitis</i> (*)
Tymoviridae	Maculavirus	<i>Maculavirus vitis</i>	Grapevine Fleck virus	GFKV	Injerto
	Marafivirus	<i>Marafivirus syrahense</i>	Grapevine Syrah virus-1	GSyV-1	Material de propagación

* Presentes en Chile

2.1.1. Género *Nepovirus*

El género *Nepovirus* posee partículas virales de forma icosaédrica con contornos hexagonales nítidos con un diámetro entre 28–30 nm, sin envoltura vírica (Figura 2.1 A). Este género de virus incluye 48 especies virales.

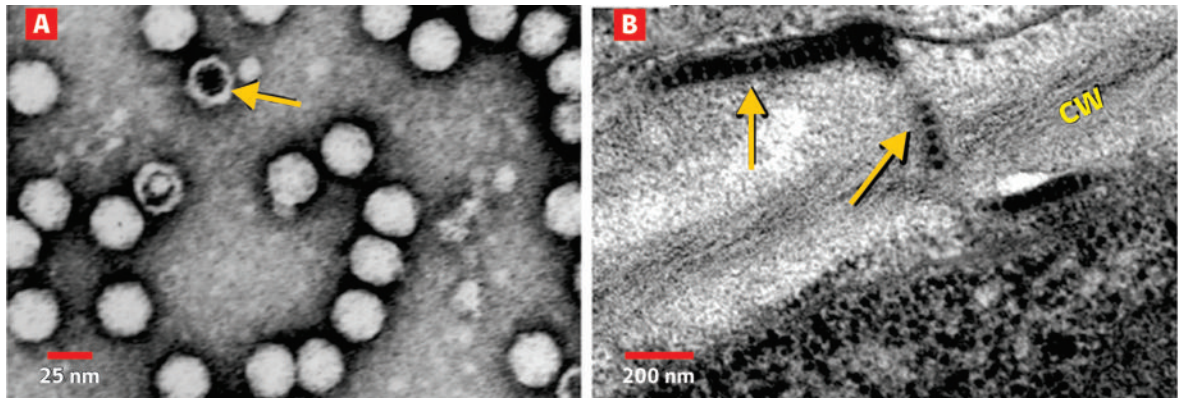


Figura 2.1. Micrografía electrónica. A: Partículas virales de ToRSV purificadas en tinción negativa. Con una flecha de color amarillo se indica la partícula que no tiene ARN en su interior y que por estar vacía es penetrada por la tinción. B: Estructura tubular que atraviesa la pared celular (CW) en células infectadas por ArMV. Se señalan con flechas de color amarillo (Fuente: Sanfaçon, 2021).

El genoma de los nepovirus consiste en una hebra simple de ARN de sentido positivo (ssARN+) dividido en dos segmentos llamados ARN1 y ARN2 (Figura 2.2), que son encapsulados por separado (Figura 2.3). Además, poseen como protección en sus extremos 5' la proteína VPg y una cola de poliadeninas en sus extremos 3' (Thompson *et al.*, 2017). Este género está dividido en tres

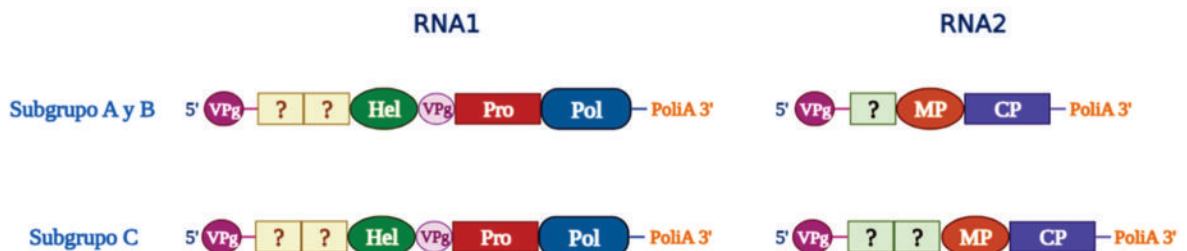


Figura 2.2. Esquema de la organización del genoma de los tres subgrupos de nepovirus. Los signos de interrogación representan las secuencias adicionales que se pueden encontrar en algunos subgrupos.

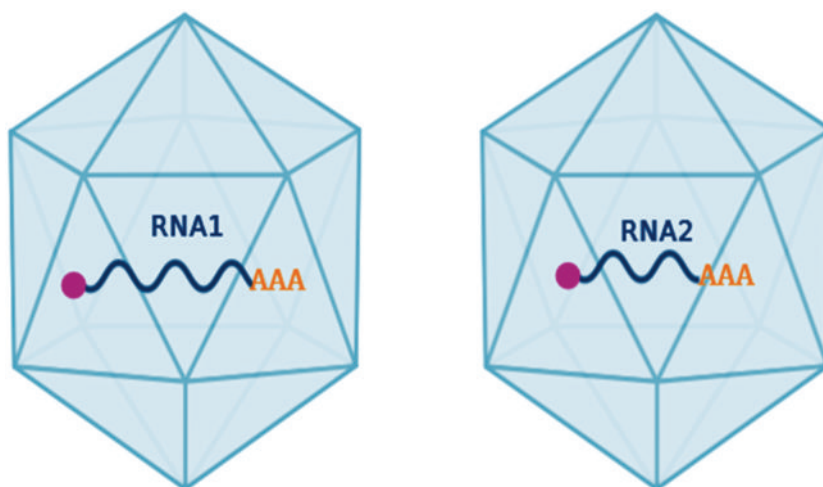


Figura 2.3. Esquema de los tipos de partículas virales de los nepovirus, donde el círculo morado corresponde a la proteína VPg unida al extremo 5' de los ARNs.

subgrupos (A, B y C) basados en el largo y empaquetamiento del ARN2, similitud de secuencias y propiedades serológicas (Thompson *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021; ICTV, 2022).

El ARN1, el primero en procesarse, codifica las proteínas para la replicación: proteína de unión a nucleótido trifosfato (NTP) o supuesta helicasa (llamada NTB o Hel); proteína viral ligada al genoma (VPg); proteasa tipo 3C (Pro) encargada de cortar ambas poliproteínas y la ARN polimerasa dependiente de ARN (Pol) (Figura 2.2). Se han encontrado dos posibles secuencias codificantes río arriba de Hel, que podrían corresponder a una característica común de los nepovirus (indicadas por signos de interrogación en la Figura 2.2), que en el caso de los virus ToRSV y ArMV se han identificado como X1, de función aún desconocida, y X2 que se cree participa en el ensamblaje del complejo de replicación (Sanfaçon, 2021). Por su parte, el ARN2 codifica la proteína de la cubierta o cápside (CP) y la proteína del movimiento (MP) que participa en la transmisión viral célula a célula (Figura 2.2), además puede contener uno o dos dominios de proteínas adicionales en su extremo 5' (indicadas por signos de interrogación en la Figura 2.2) (Sanfaçon, 2021).

Una de las principales características que distingue a los nepovirus es que codifica una sola CP grande de 53–60 kDa (Thompson *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021). Las proteínas codificadas por ambos ARNs son necesarias para que ocurra la infección sistémica del virus.

Todo el proceso de replicación y traducción del genoma viral ocurre en el citoplasma de la célula hospedera. Allí el genoma viral se libera de la cápside y, utilizando elementos del metabolismo celular, comienzan casi en paralelo los procesos de traducción y replicación de los ARNs virales. La traducción genera las poliproteínas, que luego son cortadas por la proteasa Pro, produciendo las proteínas virales maduras.

La replicación se lleva a cabo por la ARN polimerasa dependiente de RNA (Pol) que utilizaría como partidor la proteína VPg unida al extremo 5' de los ARNs virales. Este proceso sucedería en complejos de replicación asociados a vesículas derivadas de la membrana del retículo endoplasmático (ER) de la célula hospedera, los cuales contendrían todos los elementos necesarios para que este proceso ocurra, permitiendo una mayor eficiencia de replicación y protección del sistema de defensa de la planta (Thompson *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021). Inmediatamente, comienza el ensamblaje de las nuevas partículas virales que permitirán continuar con la infección del hospedero.

Las células infectadas por virus del género *Nepovirus* se caracterizan por la presencia de estructuras tubulares en o cerca de la pared celular (Figura 2.1 B), siendo su componente estructural la proteína MP. Los virus modifican la estructura de los plasmodesmos, canales que atraviesan la membrana y pared celular de las células vegetales, con estas estructuras tubulares que permiten el traslado de los viriones a la próxima célula, estrategia llamada movimiento guiado por túbulos, para el cual es necesario la interacción entre CP, MP y con el citoesqueleto de la célula hospedera (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021). Una vez que el virus alcanza el sistema vascular de la planta, infecta sistemáticamente al hospedero.

Los nepovirus que afectan la vid son transmitidos a nuevos hospederos a través de nemátodos, como también por injertos e inoculaciones mecánicas (Thompson *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021). Los nemátodos pueden mantenerse infecciosos por períodos de tiempo variables dependiendo de la especie (entre 9 semanas y 4 años) y debido a su movimiento restringido en el suelo, la transmisión del virus es lenta. La relación virus/nemátodo suele ser específica, donde una o dos especies de nemátodos transmiten un virus determinado (Cuadro 2.1) (Sanfaçon, 2021). La transmisión viral a larga distancia se debe al movimiento de material de propagación infectado.

Este género de virus, además de infectar la vid, tiene un amplio rango de hospederos (árboles frutales, arándanos, cultivos hortícolas, entre otros) y se encuentra distribuido extensamente en regiones templadas, induciendo enfermedades de gran importancia económica en una variedad de cultivos, en los cuales produce síntomas como lesiones cloróticas o necróticas, aunque muchos de sus hospederos se mantienen asintomáticos. Por otro lado, la intensidad de los síntomas dependerá de la interacción específica entre virus-hospedero y de las condiciones ambientales.

El principal método de control de este tipo de virus es la eliminación de las plantas infectadas y de los hospederos herbáceos que funcionan como reservorios del virus, como también la utilización de material vegetal certificado libre de virus. A su vez, la eliminación de los nemátodos que transmiten estos virus por fumigación del suelo con nematicidas de amplio espectro no siempre es efectiva, ya que las poblaciones de nemátodos pueden encontrarse bastante profundas en el terreno (1 m o más), haciéndolas casi imposibles de erradicar, además, este método es muy costoso y tóxico para el medioambiente. También, se han diseñado plantas con resistencia a estos virus utilizando pequeñas regiones del genoma viral, como la que codifica para la CP, con el fin de inducir el mecanismo de silenciamiento génico de ARN viral de la planta. Uno de estos casos corresponde a vides transgénicas transformadas con la región codificante de CP, que han mostrado resistencia a GFLV en un campo muy infestado con nemátodos virulíferos (Andret-Link, 2004; Sanfaçon, 2008).

En el Capítulo 3 nos enfocaremos en tres especies miembros de los nepovirus que han sido reportadas en Chile afectando el cultivo de la vid: Grapevine fanleaf virus (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV) y Tomato ringspot virus (ToRSV).

2.2. Familia *Closteroviridae*

La familia *Closteroviridae* está compuesta por 14 géneros, de los cuales nos referiremos a tres de ellos: *Closterovirus*, *Ampelovirus* y *Velarivirus*, géneros que están presentes en Chile con especies que afectan la vid. Esta familia de virus posee partículas virales filamentosas helicoidales flexibles muy largas sin envoltura (Figura 2.4 A y B), de aproximadamente 10 a 13 nm de diámetro y cuya longitud varía según el género entre 1.250 nm y 1.700 nm.



Figura 2.4. Familia *Closteroviridae*. A: Esquema de la partícula viral. B: Micrografía electrónica de partículas de Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2) con un aumento de x250000 (German-Retana *et al.*, 1999).

El genoma de esta familia es uno de los más grandes dentro de los virus de plantas (entre 13 a 19.3 kb) y consiste en una hebra simple de ARN de sentido positivo (ssARN+). La organización del genoma se mantiene muy conservado entre estos tres géneros y se caracteriza por tener diferentes marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés), cuyo número y posición en la secuencia nucleotídica del ARN puede variar según la especie viral. El ORF es una de las posibles formas en que se puede leer la secuencia de nucleótidos del genoma, lo que permite, como en el caso de algunos virus, tener varios genes solapados que codifican para distintas proteínas.

En el genoma de los integrantes de esta familia, se pueden distinguir dos bloques conservados. El primero está compuesto por los ORF1a y ORF1b, ubicado cerca del extremo 5' y que codifica proteínas relacionadas con la replicación. El ORF1a posee los dominios para una cisteína proteasa (Pro) que rompe las poliproteínas virales, una metiltransferasa (Mtr) que participa en la formación del casquete en el extremo 5' y una helicasa (Hel), mientras que el ORF1b codifica la ARN polimerasa dependiente ARN (RdRP) (Figura 2.5) (Fuchs *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021).



Figura 2.5. Esquema general de la organización del genoma viral de la familia *Closteroviridae*. Cerca del extremo 3' se observa una región destacada en color celeste con el nombre ORFs que corresponde a varios ORF que varían para cada género de la familia.

El segundo bloque abarca cinco ORFs conservados casi sin modificaciones que codifican proteínas relacionadas con el ensamblaje de viriones y el movimiento intracelular, que corresponden a una proteína hidrofóbica pequeña de membrana de 4 a 6 kDa (llamada P4 a P6 dependiendo del peso molecular) esencial para el movimiento local del virus, el homólogo de la chaperona celular HSP70 (HSP70h), una proteína de 55 a 64 kDa (denominada P55 a P64, según su peso molecular) y dos tipos de la proteína de cubierta, CP menor (CPm) y CP (Figura 2.5). Los ORFs que siguen (más cercanos al extremo 3') varían en número codificando para diferentes proteínas según cada género viral (Figura 2.5) (Fuchs *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021). Algunas de estas proteínas funcionan como supresores del silenciamiento de ARN viral, uno de los mecanismos de defensa de la planta, lo cual ayuda a la supervivencia del virus dentro de la célula hospedera (German-Retana *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2020).

El virus se ubica en el citoplasma de la célula hospedera. Los viriones se mueven a las células vecinas a través de estructuras tubulares, alcanzando finalmente el floema del sistema vascular de la planta, donde permanecen. Allí inducen en las células asociadas al floema la proliferación de grupos de vesículas membranosas derivadas del retículo endoplásmico y mitocondrias, y la formación de cuerpos de inclusión producidos por la agregación de viriones (Figura 2.6). Estas modificaciones ultraestructurales constituyen una característica de la infección por la familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph y Dawson, 2008; Fuchs *et al.*, 2020).

El control de los virus pertenecientes a estos tres géneros (*Ampelovirus*, *Closterovirus* y *Velarivirus*) se realiza a través de cuarentenas en las zonas donde la infección aún no está diseminada, la utilización de material propagativo libre de virus y el control de la población vectores que diseminan la

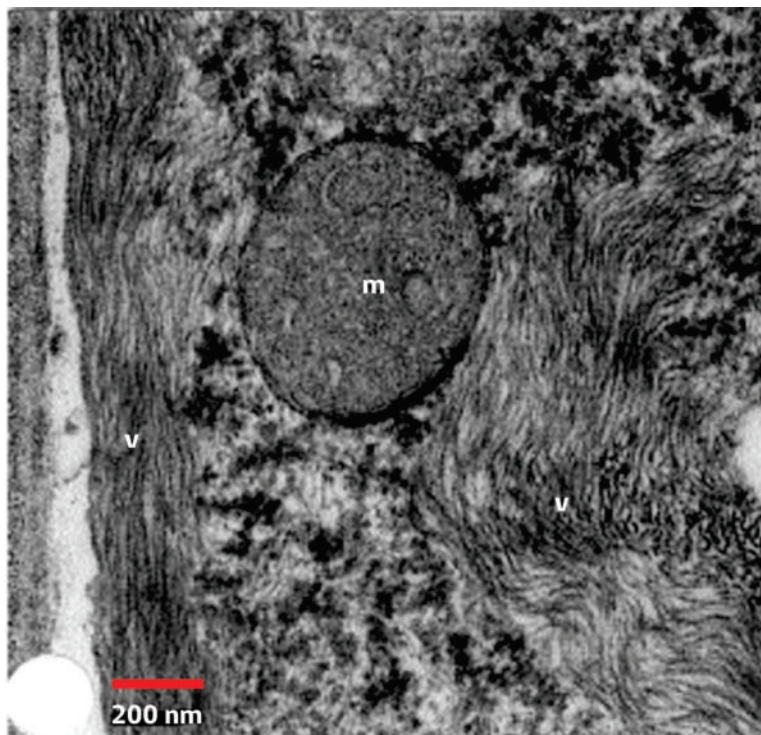


Figura 2.6. Micrografía electrónica de contraste negativo de agregados de partículas virales (V) de un integrante de la familia *Closteroviridae*, en el citoplasma de tubos cribosos de *V. vinifera* cv. Semillon. La letra m indica mitocondria (Castellano *et al.*, 2000).

infección, utilizando insecticidas de manera eficiente, aunque este método por sí solo no proporciona un control completo de la infección. Cuando la infección se ha establecido de manera más severa, se debe recurrir a la erradicación de plantas infectadas.

2.2.1. Género *Closterovirus*

Los closterovirus poseen 17 especies, de las cuales una de ellas afecta el cultivo de la vid, Grapevine leafroll-associated virus-2 (GLRaV-2), y que se encuentra presente en Chile. Los viriones de este género miden entre 1.250 y 2.200 nm de largo y entre 10 a 13 nm de ancho, y su genoma está compuesto por ocho a doce ORFs. En particular, GLRaV-2 posee un genoma de 16.5 kb y nueve ORFs (Fuchs *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021).

La diseminación de los closterovirus ocurre a través de áfidos de forma semipersistente no circulativa, sin embargo, no hay ningún vector descrito para la transmisión de GLRaV-2 (Cuadro 2.1). Al igual que en el género *Ampelovirus*, los viriones no pueden ser transmitidos por semillas o mecánicamente, pero sí pueden permanecer en injertos, lo que les permite ser transmitidos a larga distancia mediante el movimiento de material de propagación contaminado.

Los síntomas que produce GLRaV-2 en la vid se visualizan como fuerte enrollamiento de las hojas hacia abajo y enrojecimiento, como también la disminución de la eficacia de injertos (German-Retana *et al.*, 1999). Además, en algunos casos puede causar incompatibilidad de injertos (Greif *et al.*, 1995), lo que debe ser corroborado utilizando plantas indicadoras como el portainjerto Kober 5BB, tal como se describe en el Capítulo 4 de este libro.

2.2.2. Género *Ampelovirus*

Este género posee 13 especies virales (German-Retana *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2020; ICTV, 2022), de las cuales cuatro afectan el cultivo de la vid, pero sólo tres de ellas están descritas en Chile: Grapevine leafroll-associated virus-1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus-3 (GLRaV-3) y Grapevine leafroll-associated virus-4 (GLRaV-4).

Los viriones miden entre 10 a 13 nm de diámetro y 1.400 nm–2.200 nm de longitud. Respecto del genoma, los ampelovirus poseen una amplia variación en la longitud y organización de este. Por ejemplo, GLRaV-3 es uno de los que posee el genoma más grande (18.5 kb) con 13 ORFs, mientras que GLRaV-4 posee un genoma más simple (13.8 kb) con siete ORFs (Fuchs *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021).

La diseminación de los integrantes de este género ocurre de forma semipersistente no circulativa, es decir, que el vector requiere de un mayor tiempo de alimentación (minutos a horas) para adquirir el virus, como en este caso donde debe acceder al floema de la planta infectada para encontrar al patógeno, y pueden mantenerse virulentos por tres o cuatro días. La transmisión de estos virus ocurre por vectores pertenecientes a la familia *Pseudococcidae*, como chanchitos blancos, existiendo también una variación en el rango de vectores desde muy amplia a restringida, dependiendo del virus. Por ejemplo, varios de los virus GLRaVs son transmitidos por las especies *Planococcus ficus* y *Pseudococcus longispinus* (Cuadro 2.1) (Sarwar, 2020). No pueden ser transmitidos por semillas o mecánicamente, pero sí pueden permanecer en injertos (Fuchs *et al.*, 2020) y por lo tanto, ser transmitidos a larga distancia gracias al movimiento del material de propagación contaminado.

Los síntomas que causan los ampelovirus en la vid son enrollamiento y enrojecimiento de las hojas, y afectan en particular el floema, componente del sistema vascular de las plantas. De los ampelovirus que afectan el cultivo de la vid, GLRaV-3 es considerado el principal agente causal de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de vides. Este problema tiene un gran impacto, produciendo entre un 10 a 70 % de pérdidas en el rendimiento de producción a nivel mundial, ya que disminuye el contenido de azúcar, los sólidos solubles y compuestos fenólicos de las uvas, además de impactar negativamente en la eficacia del injerto y la capacidad de enraizamiento de las plantas (Fuchs *et al.*, 2020).

2.2.3. Género *Velarivirus*

El género *Velarivirus* está integrado por ocho especies. Sus partículas virales miden aproximadamente entre 10 a 13 nm de diámetro y 1.500 nm a 1.700 nm de longitud. El genoma de este género posee entre siete a nueve ORFs. En Chile se ha identificado Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7), que posee un genoma de 17.6 kb con nueve ORFs y cuyo único hospedero es la vid (Martelli *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021).

GLRaV-7 se encuentra ampliamente distribuido en las regiones del mundo en donde se cultiva la vid, sin embargo, no causa síntomas en su hospedero. Para este virus tampoco se ha descrito un vector asociado, pero puede permanecer en injertos, lo que le permite ser diseminado a larga distancia a través del material de propagación contaminado (Cuadro 2.1) (Fuchs *et al.*, 2020).

2.3. Familia *Betaflexiviridae*

La familia *Betaflexiviridae* está integrada por virus cuya estructura corresponde a partículas virales filamentosas helicoidales flexibles sin envoltura vírica, de aproximadamente 10 a 15 nm de diámetro y cuya longitud varía entre 640 nm y 1.000 nm. Las partículas virales de esta familia presentan un patrón de bandas cruzadas o líneas longitudinales en su superficie (Figura 2.7).

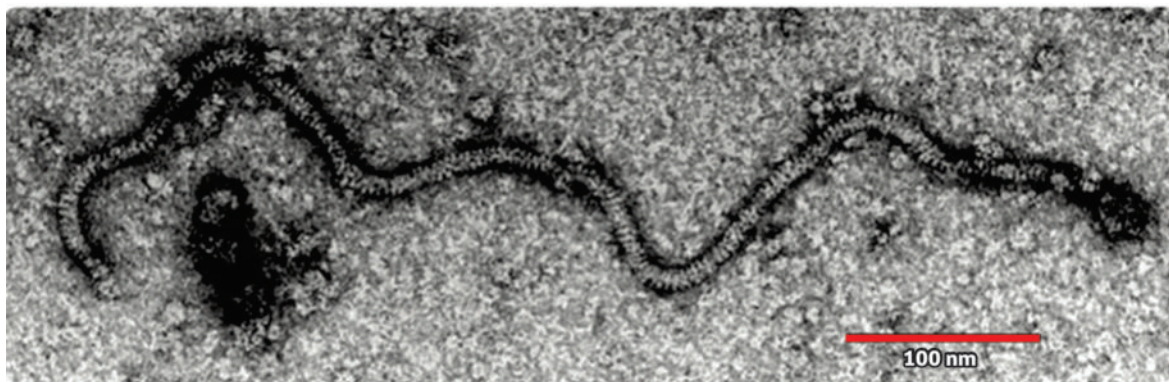


Figura 2.7. Micrografía electrónica de contraste negativo de una partícula viral de un aislado de la especie Grapevine virus A (GVA), perteneciente al género *Vitivirus*. La barra de color rojo representa 100 nm (Fuente: Adams *et al.*, 20121).

El genoma de las especies pertenecientes a la familia *Betaflexiviridae*, consiste en una hebra simple de ARN de sentido positivo (ssARN+), cuyo extremo 5' se encuentra protegido por un casquete 7-metilguanilato (m⁷G) y en su extremo 3' posee una cola de poliadeninas. La organización principal del genoma se encuentra conservada entre los miembros de la familia, pero existen diferentes ORFs para cada género viral, que codifican entre tres a seis proteínas: metiltransferasa (Mtr) involucrada en la replicación, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la proteína de movimiento (MP) que participa en el traslado del virión entre células y que en el caso de los foveavirus es reemplazada por un bloque de tres (TGB), y la proteína de cubierta (CP). En los vitivirus, entre RdRp y MP existe una proteína adicional denominada 20K. Además, en los trichovirus y vitivirus puede existir una proteína llamada NB, que tiene la capacidad de unirse a ácidos nucleicos (Figura 2.8) (Adams *et al.*, 2011).

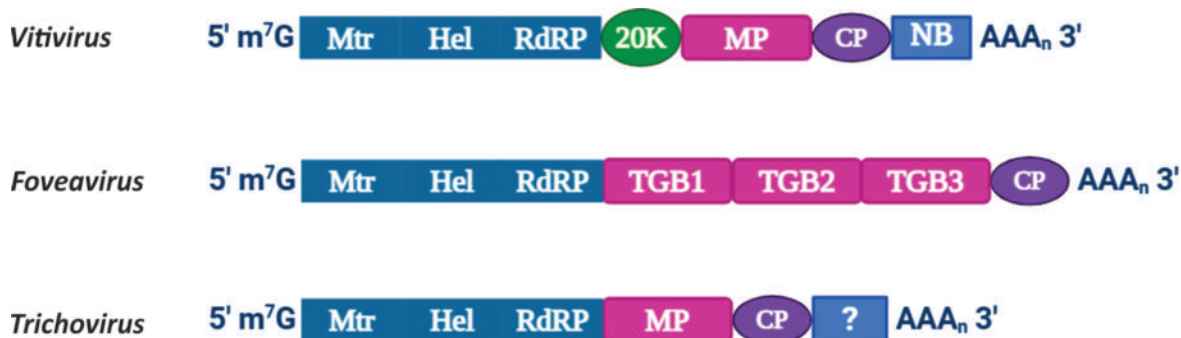


Figura 2.8. Esquema de la organización del genoma viral de los tres géneros de familia *Betaflexiviridae* estudiados en este trabajo. El signo de interrogación indica que la proteína NB puede o no estar presente en la secuencia. En los tres géneros el primer ORF codifica para tres proteínas (Mtr, Hel y RdRp)

Los viriones se encuentran en el floema y las células del parénquima de las hojas y raíces, acumulándose en grandes agregados en el citoplasma o a veces en el núcleo de estas células (Adams *et al.*, 2011). El virus se traslada de una célula a la siguiente mediante dos tipos de movimientos, dependiendo del género viral:

- Con las proteínas del bloque TGB no guiado por túbulos.
- Por el movimiento guiado por túbulos donde está involucrada la proteína MP.

Los hospederos naturales de esta familia son plantas leñosas y hongos. En el caso de los géneros *Foveavirus*, *Trichovirus* y *Vitivirus*, el rango de huéspedes está restringido a uno solo o a unos pocos

hospederos (Adams *et al.*, 2011). Los síntomas que causan los virus de esta familia son leves o simplemente no causan síntomas en el hospedero.

La transmisión de los virus pertenecientes a la familia *Betaflexiviridae* ocurre mediante vectores como chanchitos blancos y cochinillas en forma semipersistente no circulativa (Maree *et al.*, 2019), pero a gran parte de ellos no se les conoce un vector de transmisión. Otra forma de diseminación de estos virus es mediante injertos y material de propagación infectados.

2.3.1. Género *Vitivirus*

El género *Vitivirus* contempla 17 especies. Los viriones tienen una longitud de 725 nm a 825 nm y entre 10 a 15 nm de diámetro aproximadamente. El genoma es una simple hebra de ARN en sentido positivo, cuyo tamaño varía entre 7.4 kb a 7.6 kb, que se organiza en cinco ORFs. Este género se distingue porque su genoma codifica para dos proteínas adicionales (Figura 2.8): la proteína 20K, que podría estar involucrada en la transmisión por vector o en la interacción con el huésped y la proteína NB, que en vitivirus ha demostrado que puede suprimir el silenciamiento del ARN viral que forma parte del mecanismo de defensa de la planta (Adams *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2020; ICTV, 2022).

La mayoría de los vitivirus poseen una variedad de vectores, siendo los más eficaces las cochinillas. Varios autores sugieren que para una transmisión por vector eficaz de un vitivirus que infecta vides es necesaria la presencia de un ampelovirus (Maree *et al.*, 2019).

El principal huésped de la mayoría de los virus pertenecientes a este género es *Vitis* spp., razón por la cual obtienen su nombre (Maree *et al.*, 2019) y se han relacionado con el complejo de enfermedades rugosas de la madera, donde la severidad de los síntomas dependerá de la combinación virus-hospedero y las condiciones ambientales. Dentro de los miembros de este género que afectan a la vid, se han identificado en Chile a Grapevine virus A (GVA) y Grapevine virus B (GVB) (Cuadro 2.1).

2.3.2. Género *Foveavirus*

Los foveavirus poseen 12 especies virales, entre las cuales se encuentra Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) que sólo infecta vides y cuya presencia ha sido detectada en Chile (Adams *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2020; ICTV, 2022).

Las partículas virales de los *Foveavirus* tienen una longitud de entre 800 nm a 1.000 nm y aproximadamente 10 nm a 15 nm de diámetro. El genoma de GRSPaV corresponde a una hebra simple de ARN en sentido positivo de 8.7 kb, que se encuentra organizado, al igual que el del resto de los *Foveavirus*, en cinco ORFs. Este género viral se caracteriza por codificar en su genoma el bloque TGB de proteínas del movimiento (Figura 2.8) y contar con una CP grande (28 a 44 kDa).

GRSPaV es un virus relativamente joven, fue asociado a la enfermedad de picadura del tallo en el año 1998 (Zhang *et al.*, 1998). Está ampliamente distribuido en el mundo, afectando el cultivo de vid y, por lo mismo, ha sido caso de amplios estudios. Actualmente no se conoce un vector asociado a él, por lo que su diseminación ocurre mediante injerto.

2.3.3. Género *Trichovirus*

Este género está integrado por 10 especies, las cuales tienen partículas de un diámetro aproximado de 10 nm a 15 nm y una longitud de 640 nm a 760 nm. El genoma es una hebra simple de ARN en sentido positivo organizado en tres o cuatro ORFs dependiendo de la especie viral (Adams *et al.*, 2011; Koch *et*

al., 2020; ICTV, 2022). En Chile solo se ha detectado la presencia de Grapevine pinot gris virus (GPGV) en el cultivo de la vid, el cual posee un genoma de 7.2 kb organizado en tres ORFs.

La diseminación de los integrantes de este género se realiza mediante ácaros, pulgones y chanchitos blancos. En el caso específico GPGV, el vector es el ácaro *Colomerus vitis*, pero también puede diseminarse a través de injertos (Cuadro 2.1).

GPGV se reportó por primera vez en el año 2012 (Giampetruzzi *et al.*, 2011), por lo tanto, es un virus emergente causante de la enfermedad Moteado y deformación de las hojas de la vid (GLMD, por sus siglas en inglés). Estos virus producen retraso en el crecimiento de la planta, moteado, deformación de hojas y frutos, entre otros (Adams *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2020).

2.4. Familia *Tymoviridae*

Esta familia tiene seis géneros, de los cuales dos poseen especies que afectan los cultivos de vid: géneros *Maculavirus* y *Marafivirus*.

Los viriones son partículas icosaédricas con contorno redondeado, de aproximadamente 30 nm de diámetro, sin envoltura vírica (Figura 2.9). El genoma está compuesto por una hebra simple de ARN de sentido positivo (ssARN+) con un alto contenido de la base nitrogenada Citosina (entre 32 y 50 %), que tiene entre 6.000 a 7.500 pb, cuyo extremo 5' se encuentra protegido por un casquete 7-metilguanilato (m⁷G) y su extremo 3' una cola de poliadeninas (Figura 2.10) (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012; Hammond y Abrahamian, 2020).

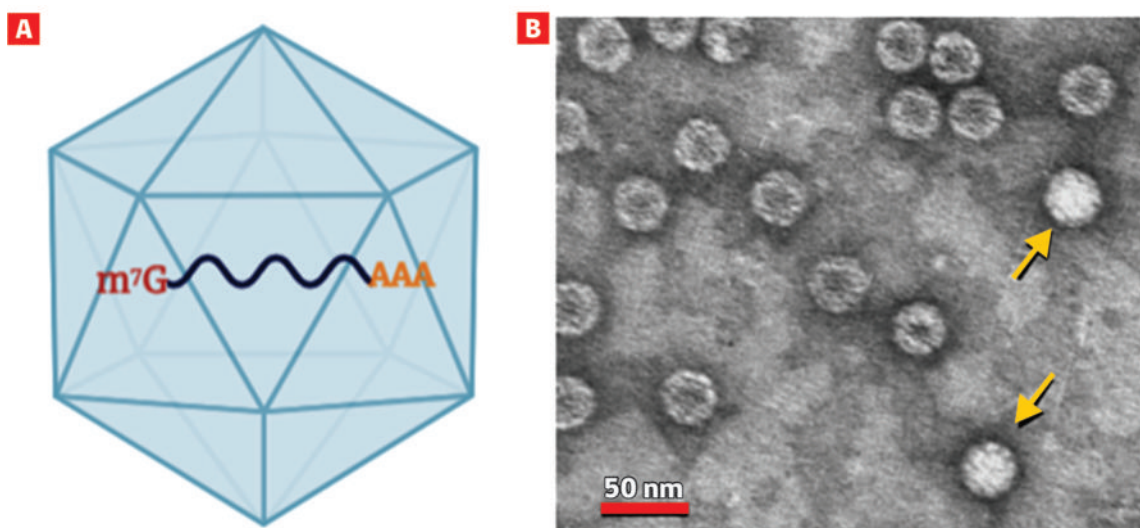


Figura 2.9. Familia *Tymoviridae*. A: Esquema de la partícula viral. B: Micrografía electrónica de contraste negativo de viriones (indicadas con flechas) y partículas virales vacías de GFKV (Martelli *et al.*, 2002).

La replicación, traducción y formación de nuevas partículas virales ocurre en el citoplasma de la célula hospedera en complejos replicativos formados de la membrana de mitocondrias o cloroplastos. El virus luego se traslada de célula a célula, alcanzando el floema donde las partículas virales permanecen restringidas (King *et al.*, 2012; ICTV, 2022).

El rango de hospederos de esta familia es reducido y a veces restringido a uno solo. La sintomatología que causan estos virus abarca desde rayas cloróticas, aclaramiento de las venas, moteado de las hojas o enanismo, entre otros (King *et al.*, 2012). Para el caso de los marafivirus y maculavirus que afectan a la vid, la diseminación ocurre principalmente a través de material de propagación infectado, (King *et al.*, 2012).

2.4.1. Género *Maculavirus*

Este género posee actualmente una sola especie, Grapevine fleck virus (GFkV), el cual se encuentra identificado en Chile (King *et al.*, 2012; ICTV, 2022). Su genoma de 7,5 kb es el más grande de la familia *Tymoviridae* y el que posee el mayor contenido de Citosina (49.8 %) (Haenni y Dreher, 2008). Este se encuentra organizado en cuatro ORFs que codifican las siguientes proteínas: metiltransferasa (Mtr), cisteína proteasa (Pro), helicasa (Hel), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), proteína de cubierta (CP) de 24 kDa y finalmente para unas proteínas de 31 (p31) y 16 KDa (p16), cuya función es desconocida (Figura 2.10) (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012; Hammond y Abrahamian, 2020).

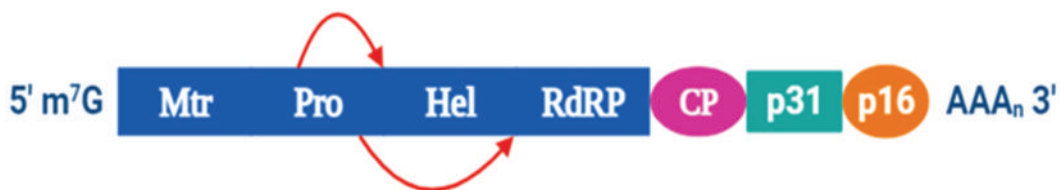


Figura 2.10. Esquema de la organización del genoma viral de GFkV. Las flechas rojas indican los sitios donde la proteasa Pro corta la poliproteína. El primer ORF codifica para cuatro proteínas (Mtr, Pro, Hel y RdRp).

Los maculavirus infectan solo a especies de *Vitis* de forma latente, a excepción de *V. rupestris* donde produce manchas translúcidas en las hojas. Hasta el momento no se conoce un vector que disemine este tipo de virus, pero se sabe que no es transmisible por inoculación mecánica ni semillas. Su principal medio de transmisión es a través de material propagativo contaminado, lo que le ha permitido esparcirse por distintas regiones del mundo (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012; Hammond y Abrahamian, 2020).

2.4.2. Género *Marafivirus*

Este género posee 11 especies virales, de las cuales Grapevine Syrah virus-1 (GSyv-1) afecta a la vid y se encuentra presente en Chile. Cuenta con un genoma viral de entre 6.3 a 6.8 kb, organizado en tres ORFs. Una característica de este género es que codifican para dos proteínas CP, una de 21 kDa (CP1) y otra de entre 22.5 a 25 kDa (CP2) (Figura 2.11) (Hammond y Abrahamian, 2020).



Figura 2.11. Esquema de la organización del genoma viral del género *Marafivirus*. Las flechas rojas indican los sitios donde la proteasa Pro corta la poliproteína. El primer ORF codifica para cuatro proteínas (Mtr, Pro, Hel y RdRp).

GSyV-1 posee un genoma de 6506 bp y se encuentra presente en varios países donde se cultiva la vid. Esta especie corresponde a un virus emergente, ya que fue detectado por primera vez en el año 2009 en USA en plantas de vides que manifestaban la enfermedad del Declinamiento de Syrah (Rwahnih *et al.*, 2009), debido a esto inicialmente se le consideró el agente causal de esta enfermedad. Sin embargo, estudios posteriores han determinado que hasta el momento no puede asociarse un virus con la etiología de esta enfermedad (Xiao *et al.*, 2022). Asimismo, tampoco se ha podido definir una sintomatología para este virus, ya que se ha encontrado como parte de infecciones mixtas o en plantas con la enfermedad Declinamiento de syrah.

No se han determinado vectores para la diseminación del GSyV-1 y, como el resto de las especies de este género, no puede transmitirse por inoculación mecánica ni por semillas. Por lo tanto, su diseminación ocurre principalmente mediante material de propagación contaminado (King *et al.*, 2012; Hammond y Abrahamian, 2020).

En Chile existe hasta la fecha solo un reporte de GSyV-1, el cual fue determinado en una muestra de cv. Syrah de la Región del Libertador Bernardo O'Higgins en el año 2010 (Engel *et al.*, 2010b).

2.5. Bibliografía

- Adams, M.J.; Candresse, T.; Hammond, J.; Kreuze, J.F.; Martelli, G.P.; Mamba, S.; Pearson, M.N.; Ryu, K.H.; Saldarelli, P.; Yoshikawa, N. (2011). Family *Betaflexiviridae*. En Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 920-941). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384684-6.00078-1>
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., y Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86(3), 183-195. <http://www.jstor.org/stable/41992424>
- Arancibia, M., y Auger, J. (1987). Sensibilidad del complejo del enrollamiento de la hoja de vid (*Vitis vinifera* L.) presente en Chile a la termoterapia. *Simiente*, 57, 96
- Auger, J., Aballay, E., Pinto, M., y Pastenes, C. (1994). Efectos del virus de la hoja en abanico en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv Thompson Seedless. *Aconex*, 46, 20-23. Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.14001/47904>
- Bar-Joseph, M., & Dawson, W. (2008). Citrus tristeza virus. En *Encyclopedia of Virology* (Third Edition) (pp. 520-525). <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00639-7>
- Castellano, M.A., Abou-Ghanem, N., Choueiri, E., y Martelli, G.P. (2000). Ultrastructure of Grapevine leafroll-associated virus 2 and 7 infections. *Journal of Plant Pathology*, 82(1), 9-15. <https://www.jstor.org/stable/41997974>
- Cereceda L., Consuelo, Auger S., Jaime (May-Ago 1979). Aislamiento y caracterización del virus mosaico amarillo de la vid (*Vitis vinifera* L. cv. Semillon) presente en Chile [en línea]. *Investigación Agrícola*. v. 5(2) p. 83-88. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/44861>

- Engel, E. A., Escobar, P., Montt, C., Gómez-Talquenca, S., & Valenzuela, P. D. T. (2008). First Report on the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 7 and 9 in Chilean grapevines. *Plant Disease*, 92(8), 1252. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-8-1252c>
- Escobar, P. F., Fiore, N., Valenzuela, P. D. T., & Engel, E. A. (2008). First detection of Grapevine leafroll-associated virus 4 in Chilean grapevines. *Plant Disease*, 92(10), 1474. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-10-1474c>
- Engel, E. A., Escobar, P. F., Rivera, P. A., & Valenzuela, P. D. T. (2010a). First Report on the occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 5 in Chilean grapevines. *Plant Disease*, 94(8), 1067. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-8-1067a>
- Engel, E. A., Rivera, P. A., & Valenzuela, P. D. T. (2010b). First Report of Grapevine syrah virus-1 in Chilean grapevines. *Plant Disease*, 94(5), 633. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-5-0633a>
- Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A.M. y Zamorano, A. (2008). Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1), 125–130. <http://www.jstor.org/stable/41998470>
- Fuchs, M. (2020). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal Of Plant Pathology*, 102(3), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2>
- Fuchs, M., Bar-Joseph, M., Candresse, T., Maree, H. J., Martelli, G. P., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Sabanadzovic, S., & Consortium, I. R. (2020). ICTV virus taxonomy profile: *Closteroviridae*. *Journal Of General Virology*, 101(4), 364–365. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001397>
- German-Retana, S., Candresse, T., & Martelli, G. (1999). *Closteroviruses (Closteroviridae)*. En *Enciclopedia of virology (Second Edition)* (pp. 266–273). <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0053>
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., & Saldarelli, P. (2011). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010>
- Greif C., Garau R., Boscia D., Prota V.A., Fiori M., Bass P., Walter B., y Prota U. (1995). The relationship of grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 34(3), 167–173. <http://www.jstor.org/stable/42685224>
- Haenni, A., & Dreher, T. (2008). Tymoviruses. En *Enciclopedia of virology (Third Edition)* (pp. 199–207). <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00523-9>
- Hammond, R. W., & Abrahamian, P. (2020). Tymoviruses (*Tymoviridae*). En *Enciclopedia of virology (Fourth Edition)* (pp. 818–826). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21305-8>
- Herrera M., Guido, Madariaga V., Mónica (Oct-Dic 2001). Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile [en línea]. *Agricultura Técnica*. v. 61(4) p. 393–400. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/40336>

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2022). The Master Species List: A spreadsheet of current taxonomy. (2022). Master Species Lists (MSL). Recuperado 6 de julio de 2023, de <https://ictv.global/msl>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. y Lefkowitz, E. eds.) (2012). *Tymoviridae*. En *Virus Taxonomy* (pp.944-952). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00080-X>
- Koch, K. G., Jones, T. L., & Badillo-Vargas, I. E. (2020). Arthropod vectors of plant viruses. En *Applied Plant Virology: Advances, detection and antiviral strategies* (pp.349-379) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00026-8>
- Maree, H. J., Blouin, A. G., Diaz-Lara, A., Mostert, I., Rwahni, M. A., & Candresse, T. (2019). Status of the current vitivirus taxonomy. *Archives Of Virology*, 165(2), 451-458. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04500-w>
- Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., & Saldarelli, P. (2002). Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Archives Of Virology*, 147(9), 1847-1853. <https://doi.org/10.1007/s007050200046>
- Martelli, G.P., Ghanem-Sabanadzovic, N.A., Agranovsky, A., Rwahni, M.A., Dolja, V.V., Dovas, C.I., Fuchs, M.F., Gugerli, P., Hu, J.S., Jelkmann, W., Katis, N.I., Maliogka, V.I., Melzer, M.J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M.E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., y Saldarelli, P. (2012). Taxonomic revision of the family closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94, 7-19. <http://www.jstor.org/stable/45156004>
- Rwahni, M. A., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387(2), 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028>
- Sánchez, R., y Hepp, R. (1994). Prospección de *Nepovirus* y *Closterovirus* en viñedos de la VII Región. *Simiente*, 64, 100
- Sanfaçon, H. (2008). *Nepovirus*. En *Encyclopedia of Virology* (Third Edition) (405-413). <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00449-0>
- Sanfaçon, H. (2021). *Nepoviruses* (*Secoviridae*). En *Encyclopedia of Virology* (Fourth Edition) (486-494). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21251-X>
- Sarwar, M. (2020). Insects as transport devices of plant viruses. En *Applied Plant Virology: Advances, detection and antiviral strategies* (pp.381-402). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00027-X>
- Schmitt-Keichinger, C., Hemmer, C., Berthold, F., Ritzenthaler, C. (2017). Molecular, Cellular, and Structural Biology of Grapevine fanleaf virus Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (pp.83-107). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_4

- Servicio Agrícola y Ganadero [SAG]. (2023). Establece programa de acciones fitosanitarias inmediatas de emergencia para el control de Grapevine pinot gris virus (GPGV). Recuperado 20 de mayo de 2024, de https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/Res.%20N%C2%B0%206405_2023%20GPGV.pdf
- Song, Y., Hanner, R. H., & Meng, B. (2021). Probing into the effects of Grapevine leafroll-associated viruses on the physiology, fruit quality and gene expression of grapes. *Viruses*, 13(4), 593. <https://doi.org/10.3390/v13040593>
- Thompson, J. R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A. V., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Tzanetakis, I., Van Der Vlugt, R., Wetzel, T., & Yoshikawa, N. (2017). ICTV virus taxonomy Profile: *Secoviridae*. *Journal Of General Virology*, 98(4), 529–531. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000779>
- Xiao, H., Roscow, O., Hooker, J., Li, C., Maree, H. J., & Meng, B. (2022). Concerning the etiology of Syrah decline: A fresh perspective on an old and complex issue facing the global grape and wine industry. *Viruses*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.3390/v15010023>
- Zamorano, A., Medina, G., Fernández, C., Cui, W., Quiroga, N., & Fiore, N. (2019). First report of Grapevine pinot gris virus in grapevine in Chile. *Plant Disease*, 103(6), 1438. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-18-1855-pdn>
- Zhang, Y., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., & Rowhani, A. (1998). Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with Grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology*, 88(11), 1231–1237. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.11.1231>



Enfermedades causadas por virus que afectan el cultivo de la vid en Chile

Capítulo

3



Enfermedades causadas por virus que afectan el cultivo de la vid en Chile

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.

Nelly Nova L.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

En el ámbito de la agricultura, los virus son probablemente los fitopatógenos más difíciles de controlar, puesto que no existe un control químico y su contención se basa solo en métodos preventivos. En la fruticultura, los virus han causado graves daños en numerosos cultivos a través de la historia, siendo testimonio de ello las grandes devastaciones y pérdidas económicas a nivel mundial causadas por algunos de estos patógenos.

Al igual que en el resto del mundo, los viveros y huertos de Chile se han visto afectados por infecciones virales. En viveros, estos patógenos pueden afectar la producción de plantas, ya sea porque causan incompatibilidad en la unión variedad-portainjerto, por disminuir el porcentaje de prendimiento de yemas, o simplemente afectando el crecimiento de la planta. Por su parte, en los huertos pueden causar una disminución en los rendimientos y calidad de los productos agrícolas, como también retraso en el crecimiento de las plantas. Debido a esto, se vuelve necesario desarrollar estrategias para la producción de plantas libres de virus y mantener un riguroso control sobre el ingreso de material vegetal al país. De igual forma, los productores juegan un rol fundamental en evitar que este tipo de enfermedades devasten zonas completas de determinados cultivos; para lo cual deben comprender la importancia de controlar, de manera eficiente, estas infecciones a través de la erradicación de plantas infectadas y el control eficaz de los vectores que las transmiten.

El trabajo en conjunto de todos los actores involucrados en la cadena productiva se hace cada día más necesario para asegurar el crecimiento sostenible de la agricultura chilena y mejorar la calidad de los productos agrícolas, ya sea plantas o productos finales de consumo. Un buen ejemplo de esto es la Resolución Exenta 4.145, publicada en el Diario Oficial el 9 de julio de 2021 (SAG, 2021), resultado de un grupo de trabajo conformado por representantes de la empresa privada, INIA, universidades y liderado por el SAG, autoridad oficial encargada de proteger y mejorar la condición fitosanitaria de los recursos productivos del ámbito silvoagrícola. Esta resolución establece como plagas no cuarentenarias reglamentadas para el material de propagación de especies de vid a Grapevine fanleaf virus (GFLV) y Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) y tiene alcance sobre las vías de dispersión de los virus, el proceso productivo de plantas corrientes, uso del material de propagación, lugares de producción, insumos, trazabilidad y operadores, la cual se complementa con la Resolución Exenta 981 (SAG, 2014), que norma la producción de plantas en los viveros y depósito de plantas.

De la totalidad de especies virales que afectan el cultivo de la vid, alrededor de 31 son causantes de las cuatro enfermedades más importantes: Degeneración infecciosa de la vid, Declinamiento de la vid, Enrollamiento de la hoja de la vid y Complejo rugoso de la madera (Cuadro 3.1), las cuales provocan síntomas como malformación y afección en el color de hojas tales como: amarillamiento, moteado

Cuadro 3.1. Principales enfermedades de origen viral que afectan a la vid y su agente causal.

Nombre de la enfermedad	Nombre del agente causal	Acrónimo	Especie
Degeneración infecciosa y declinamiento de la vid	Grapevine fanleaf virus *	GFLV	<i>Nepovirus foliumflabelli</i>
	Arabis mosaic virus *	ArMV	<i>Nepovirus arabis</i>
	Grapevine deformation virus	GDeV	<i>Nepovirus deformationis</i>
	Grapevine chrome mosaic virus	GCMV	<i>Nepovirus chromusivum</i>
	Tomato black ring virus	TBRV	<i>Nepovirus nigranuli</i>
	Grapevine Anatolian ringspot virus	GARSV	<i>Nepovirus anatoliense</i>
	Artichoke Italian latent virus	AILV	<i>Nepovirus italiaense</i>
	Grapevine Tunisian ringspot virus	GTRSV	<i>Nepovirus tunisiaense</i>
	Raspberry ringspot virus	RpRSV	<i>Nepovirus rubi</i>
	Grapevine Bulgarian latent virus	GBLV	<i>Nepovirus bulgariense</i>
	Strawberry latent virus	SLRV	<i>Stralarivirus fragariae</i>
	Cherry leaf roll virus	CLRV	<i>Nepovirus avii</i>
	Tomato ringspot virus *	ToRSV	<i>Nepovirus lycopersici</i>
	Tobacco ringspot virus	TRSV	<i>Nepovirus nicotianae</i>
	Peach rosette mosaic virus	PRMV	<i>Nepovirus persicae</i>
	Blueberry leaf mottle virus	BLMoV	<i>Nepovirus myrtilli</i>
Enrollamiento de la hoja de la vid	Grapevine leafroll-associated virus 1 *	GLRaV-1	<i>Ampelovirus univitis</i>
	Grapevine leafroll-associated virus 2 *	GLRaV-2	<i>Closterovirus vitis</i>
	Grapevine leafroll-associated virus 3 *	GLRaV-3	<i>Ampelovirus trivitis</i>
	Grapevine leafroll-associated virus 4 *	GLRaV-4	<i>Ampelovirus tetravitis</i>
	Grapevine leafroll-associated virus 7 *	GLRaV-7	<i>Velarivirus septemvitis</i>
	Grapevine leafroll-associated virus 13	GLRaV-13	<i>Ampelovirus tredecimvitis</i>
Complejo rugoso de la madera	Grapevine virus A *	GVA	<i>Vitivirus alphavitis</i>
	Grapevine virus B *	GVB	<i>Foveavirus rupestris</i>
	Grapevine virus D	GVD	<i>Vitivirus deltavitis</i>
	Grapevine virus E	GVE	<i>Vitivirus epsilonvitis</i>
	Grapevine virus F	GVF	<i>Vitivirus phivitis</i>
	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*	GRSPaV	<i>Foveavirus rupestris</i>
Fleck	Grapevine Fleck virus *	GFKV	<i>Maculavirus vitis</i>
	Grapevine asteroid mosaic-associated virus	GAMaV	<i>Marafivirus asteroides</i>
	Grapevine rupestris vein feathering virus	GRVfV	No ha sido aprobado como especie por el ICTV (**)
	Grapevine red globe virus	GRGV	<i>Grablovirus vitis</i>
Enfermedades emergentes	Grapevine pinot gris virus *	GPGV	<i>Trichovirus pinovitis</i>
	Grapevine Syrah virus-1 *	GSyV-1	<i>Marafivirus syrahense</i>
	Grapevine red blotch associated virus	GRBaV	<i>Grablovirus vitis</i>

*: virus identificados en Chile.

** : International Committee on taxonomy of Viruses.

clorótico y manchas anulares; además, pueden presentarse síntomas en la madera, como picaduras o surcos. También se puede observar una disminución del crecimiento de la planta causado por una brotación retardada de la yema y menor velocidad en el desarrollo, lo que puede provocar reducción de los rendimientos y calidad de la fruta (Martelli, 2017).

El desarrollo de herramientas moleculares ha permitido determinar que en Chile están presentes algunos de los virus que son agentes causales de estas enfermedades (Cuadro 3.1). En el caso de las enfermedades Declinamiento de la vid y Degeneración infecciosa de la vid, se han descrito en Chile tres de los 16 agentes causales de esta enfermedad: GFLV, el principal representante, identificado a finales de la década de los 70 (Cereceda y Auger, 1979), Arabis mosaic virus (ArMV) detectado a mediados de los años 90 (Herrera y Madariaga, 1994) y Tomato ringspot virus (ToRSV), el cual solo ha sido identificado en nuestro país mediante la prueba ELISA (Herrera y Madariaga, 1994).

En cuanto a la enfermedad Enrollamiento de la hoja de la vid, cinco de los seis agentes causales han sido determinados en Chile (Cuadro 3.1) (Sanchez, 1995; Escobar *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2008; Fiore *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2010a). Para el Complejo rugoso de la madera, se han descrito tres de los seis virus que causan la enfermedad (Fiore *et al.*, 2008). En esta misma publicación, los autores identificaron a Grapevine fleck virus (GFkV), un virus de menor importancia y que no causa mayores síntomas (Cuadro 3.1).

En los últimos años, en las principales regiones productoras de uva en el mundo, se han determinado otros virus conocidos como “virus emergentes” debido a que su incidencia ha aumentado significativamente. Las técnicas de secuenciación masiva han permitido un gran avance en este tema. Las tres enfermedades más conocidas causadas por estos fitopatógenos emergentes son: Moteado y deformación de las hojas de la vid causada por Grapevine pinot gris virus (GPGV); Declinamiento del Syrah, inicialmente asociada a Grapevine syrah virus-1 (GSyV-1), aunque estudios posteriores demostraron que no es posible asociarlo como agente causal de dicha enfermedad y Mancha roja de la vid causada por Grapevine red blotch associated virus (GRBaV). De estos, los dos primeros [virus] han sido determinados en Chile (Engel *et al.*, 2010b; Zamorano *et al.*, 2019).

3.1. Descripción de enfermedades virales en vides presentes en Chile

Entre las cuatro principales enfermedades de origen viral que afectan la vid, aquellas causadas por GFLV y por el complejo viral conformado por las cinco especies de GLRaV se pueden considerar como las más importantes en Chile debido a su alta prevalencia y efectos que causan en el cultivo.

El virus GFLV causa un efecto importante en la calidad de la fruta, provocando una disminución del contenido de azúcar y de la acidez titulable (Andret-Link *et al.*, 2004). Dependiendo de las condiciones ambientales y de los aislados del virus, también se presentan otros efectos negativos para la producción de uva, tales como millerandage y retrasos en el crecimiento.

En Chile, este virus ha sido una preocupación desde muchos años atrás, pues ya en 1973 se describen los efectos de la hoja de abanico de la vid en viñedos chilenos (Valenzuela, 1973). Luego de ser oficialmente identificado y caracterizado en 1979 (Cereceda y Auger, 1979), se realizaron estudios referentes a los efectos de este virus en la producción de uva (Auger *et al.*, 1998). Los resultados de este estudio indicaron diferencias entre plantas sanas y enfermas en parámetros tales como: diámetro del tronco, longitud de las ramillas, el diámetro de las bayas, el contenido de sólidos solubles y el rendimiento, entre otros.

En el caso de los virus causantes del enrollamiento de la hoja de la vid, generan una baja en el rendimiento. En Chile, se han realizado estudios en la variedad Cabernet Sauvignon sobre la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas y del metabolismo del azúcar, los cuales revelaron una maduración incompleta de las bayas en plantas infectadas (Vega *et al.*, 2011).

Los efectos de las infecciones causadas por todos estos virus, justifican un esfuerzo para el establecimiento de parronales y viñedos libres de ellos, comenzando por una producción de plantas libres de virus y un control eficiente de los vectores que los transmiten. Por ejemplo, para GFLV, cuyo vector es el nemátodo *Xiphinema index*, es importante utilizar suelos libres de este vector manteniendo en consideración que el nemátodo conserva su capacidad infecciosa durante muchos años, incluso en ausencia del huésped (Demangeat *et al.*, 2005). Para el complejo viral de GLRaV es importante el control eficiente de chanchitos blancos y conchuelas, tanto en viveros como durante toda la vida útil de las plantas en parronales y viñedos.

3.1.1. Degeneración infecciosa y declinamiento de la vid

Para esta enfermedad la literatura describe 16 virus (Martelli, 2017), pertenecientes al género *Nepovirus* (Cuadro 3.1). El principal representante es el nepovirus GFLV, cuya diseminación ocurre mediante el nemátodo *Xiphinema index* e injertos (Cuadro 2.1). En Chile, este virus afecta parronales y viñedos generando pérdidas en rendimiento que se han estimado en un 12 % (Herrera, 2000). GFLV se manifiesta en forma de tres síndromes diferentes que a continuación se describen:

- a. **Síndrome deformación infecciosa:** se manifiesta con una deformación de la lámina de la hoja (Figura 3.1), que puede presentar dentaciones agudas (Figura 3.2), hojas asimétricas o arrugadas (Figura 3.3). Estas deformaciones pueden ir acompañadas de moteado clorótico, como se observa en la Figura 3.4. En los brotes se puede observar entrenudos cortos y un crecimiento en Zig-Zag. Además, los racimos no cuajan bien, observándose millerandage y una maduración irregular de las bayas (Figura 3.5).



Figura 3.1. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV), manifestando en sus hojas deformaciones asociadas al síndrome de deformación infecciosa.



Figura 3.2. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la imagen se puede observar que las hojas presentan dentaciones agudas al borde de la lámina foliar.



Figura 3.3. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV), se observan hojas asimétricas y con deformación.



Figura 3.4. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). Se puede observar hojas con un moteado amarillo asociado al síndrome de deformación infecciosa.



Figura 3.5. Racimo de una planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la imagen se puede apreciar la maduración irregular de las bayas.

- b. **Síndrome mosaico amarillo:** este síndrome se expresa tornando cloróticas las hojas de las plantas infectadas con este virus. En la lámina foliar pueden presentarse manchas de color amarillo intenso brillante que se manifiestan en primavera (Figura 3.6) y pueden persistir hasta el verano (Figuras 3.7 y 3.8). En algunos casos, se puede observar un patrón de clorosis que inicia en las venas secundarias y puede abarcar las venas principales (Figuras 3.9 y 3.10). Estos síntomas pueden ir acompañados de deformación de hojas, entrenudos cortos, maduración irregular del racimo, millerandage y corrimiento.



Figura 3.6. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la fotografía se puede observar las hojas de un amarillo intenso brillante.



Figura 3.7. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la fotografía se puede observar la lámina de una hoja con un color amarillo cremoso.



Figura 3.8. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). Se observa una hoja que a final de verano aún mantiene un color amarillo intenso.

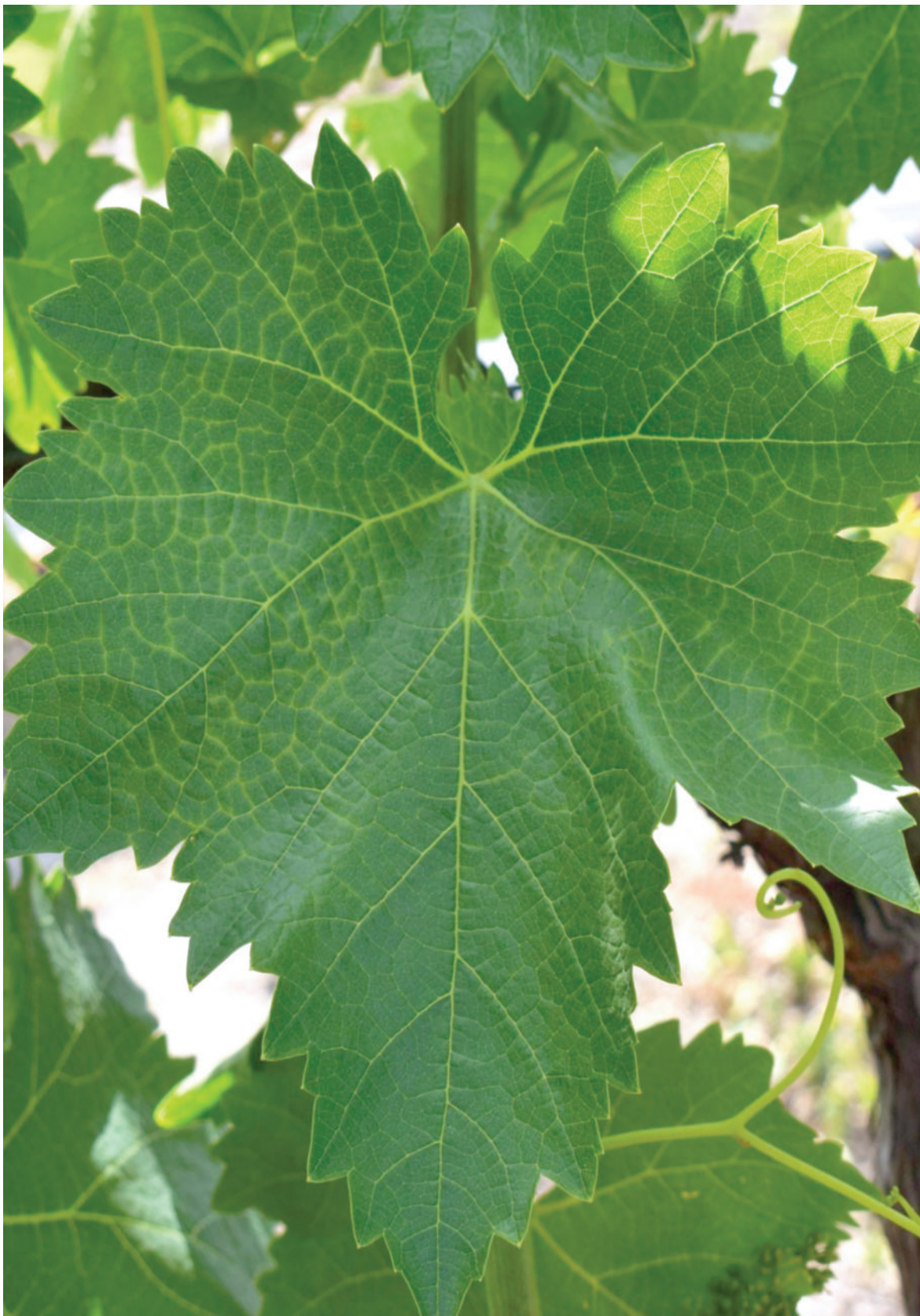


Figura 3.9. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la imagen se puede observar una hoja que manifiesta clorosis en las venas secundarias.



Figura 3.10. Planta de vid infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la fotografía se observa una de sus hojas con síntomas de clorosis en la vena principal y secundarias.

- c. **Síndrome Vein Banding:** la sintomatología causada por este síndrome consiste en un moteado amarillo que se organiza a lo largo de la nervadura y que puede llegar a cubrir totalmente la lámina de la hoja (Figuras 3.11 y 3.12). Este síntoma no va asociado a deformación de hojas y se observa en pleno verano.



Figura 3.11. Hoja de vid proveniente de una planta infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la imagen se puede observar el bandeo clorótico en la nervadura principal y secundarias.



Figura 3.12. Hoja de vid proveniente de una planta infectada con Grapevine fanleaf virus (GFLV). En la fotografía se puede observar un moteado amarillo alrededor de las de venas principales.

Otro nepovirus presente en Chile que actúa como agente causal de esta enfermedad es Arabis mosaic virus (ArMV), el cual es diseminado principalmente por el nemátodo *Xiphinema diversicaudatum* que no está presente en Chile, por lo tanto, su mayor fuente de diseminación es el material de propagación (Cuadro 2.1). En la década de 1990, en Chile se detectó la presencia del nepovirus Tomato ringspot virus (ToRSV) mediante la prueba ELISA (Herrera y Madariaga, 1994 y 2001; Madariaga-Peñaloza, 1998). Sin embargo, hasta la fecha, esta detección no ha sido confirmada mediante otras técnicas de laboratorio.

La literatura reporta a ToRSV como uno de los virus más difíciles de controlar pues, aunque tiene como principal vector el nemátodo *Xiphinema americanum sensu lato*, también puede ser transmitido por varias especies de nemátodos y semillas en el caso de ciertas malezas (Cuadro 2.1). Los síntomas causados por ArMV y ToRSV son muy difíciles de distinguir, pues la mayor parte de las veces se encuentran asociados a GFLV.

La degeneración infecciosa tiene un impacto económico importante y, tal como ocurre en todas las enfermedades causadas por virus, los efectos en el hospedero dependen de la variedad, el portainjerto, las condiciones climáticas de la zona de cultivo, la edad en la que se infectó la planta y el aislado viral. En Chile, se reportó una reducción de rendimientos en el cultivar Thompson seedless infectado con GFLV (Auger *et al.*, 1992), mientras que otros reportes internacionales indican que el rendimiento puede bajar hasta en un 80 % (Digiario *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2021).

La diseminación de esta enfermedad está dada principalmente por propagación de material vegetal e injertos infectados, pero también por vectores como nemátodos. Debido a esto, las principales medidas de control de esta enfermedad deben hacerse de manera preventiva, utilizando material de propagación y portainjertos libre de virus, como también verificar la sanidad de los suelos a utilizar antes del establecimiento de las vides en el campo.

3.1.2. Enrollamiento de la hoja de la vid

Esta enfermedad es causada por un complejo de virus compuesto por seis especies, cuyo nombre se forma por Grapevine leafroll associated virus (GLRaV) seguido de un número (1,2,3,4,7,13). En Chile están presentes todos, excepto GLRaV-13 (Cuadro 3.1).

Diversos estudios moleculares han demostrado que estas especies virales comparten una misma familia, pero distribuidas en tres géneros diferentes (Cuadro 2.1). Este grupo de virus causa grandes pérdidas económicas, ya que las plantas afectadas son menos vigorosas, la fruta presenta retraso en la maduración, aumento en la acidez, disminución de sólidos solubles y falta de color en las bayas de las variedades tintas. En hojas, la sintomatología corresponde a enrollamiento de la lámina foliar y permanencia del color verde en las venas al final del verano (Figura 3.13). Los síntomas son más marcados en los cultivares de uva tinta, en donde el color marrón aparece en la lámina muy temprano (Figura 3.14), mientras que en los cultivares de uva blanca se observa sólo una clorosis leve en la hoja (Figura 3.15) (Cieniewicz *et al.*, 2015). Al observar la sintomatología que manifiestan las plantas al estar infectadas con alguna de estas especies, es imposible distinguir cuál de ellas es la responsable, por lo tanto, se debe recurrir a análisis moleculares de laboratorio.



Figura 3.13. Planta de vid variedad de uva tinta infectada con Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV). En la fotografía se puede observar en detalle el color marrón en la zona intervenal, mientras las venas se mantienen de color verde.



Figura 3.14. Planta variedad uva tinta infectada con Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV). Se puede observar el enrollamiento de las hojas y color marrón de la zona intervenal.



Figura 3.15. Hojas de vid variedad uva blanca infectada con Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV). Se observa el enrollamiento de la lámina foliar y manchas amarillas correspondientes a la clorosis de la hoja.

A continuación, se describirán algunas características de los GLRaVs descritos en Chile.

- a. **GLRaV-1:** pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Ampelovirus* (Cuadro 2.1). Este virus es causante de los síntomas asociados a la enfermedad del enrollamiento de la hoja de la vid, ya sea cuando ha sido determinado sólo o en asociación con otros Grapevine leafroll virus. GLRaV-1 se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y se transmite a larga distancia mediante material de propagación infectado, y a corta distancia mediante varias especies de chanchitos blancos y escamas, de las cuales en Chile están presentes *P. Longispinus* y *P. corni*.
- b. **GLRaV-2:** pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus* (Cuadro 2.1). Esta especie viral además de causar enrollamiento puede generar otros trastornos como la incompatibilidad de injertos (Greif *et al.*, 1995). GLRaV-2 no tiene un vector de diseminación asociado, por lo tanto, su transmisión ocurre mediante la propagación de material vegetal e injertos infectados. Este virus tiene varias variantes genéticas de las cuales dos han sido determinadas en Chile, GLRaV-5 y GLRaV-9 (Engel *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2010a). Estas variantes podrían llegar a causar graves problemas de incompatibilidad entre el patrón y el injerto.
- c. **GLRaV-3:** pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Ampelovirus* (Cuadro 2.1). Es el principal agente causal de esta enfermedad y el más estudiado. La literatura reporta que genera pérdidas valuadas entre los U\$ 20.000 y U\$ 200.000 por hectárea en USA (Atallah *et al.*, 2012; Ricketts *et al.*, 2015). La diseminación de este virus ocurre mediante material de propagación infectado, injertos y varias especies de chanchitos blancos y escamas, entre las cuales en Chile se encuentran *P. ficus*, *P. Longispinus*, *P. citri*, *P. viburni* y *P. calceolariae*. Respecto de los síntomas, estos son muy similares a los que causan los otros GLRaVs. En las variedades tintas, a finales del verano, la lámina de la hoja se torna marrón manteniendo las venas de color verde y posteriormente ocurre el enrollamiento de la lámina foliar (Figura 3.13). En las variedades blancas no se observa comúnmente el color rojizo, pero sí clorosis en la lámina de la hoja y enrollamiento de las hojas (Figura 3.15).
- d. **GLRaV-4:** pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Ampelovirus* (Cuadro 2.1). Ha sido reportado en varias regiones del mundo en donde se cultiva la vid. La transmisión se realiza mediante el movimiento de material infectado, injerto y también por vectores como chanchitos blancos y escamas. Respecto de los síntomas causados por GLRaV-4, estos no se pueden diferenciar del resto de los GLRaVs que causan esta enfermedad.
- e. **GLRaV-7:** pertenece a la familia *Closteroviridae* y al género *Velarivirus* (Cuadro 2.1). Este virus está distribuido ampliamente en el mundo, sin embargo, sólo infecta a la vid y no causa síntomas en ella. Su diseminación ocurre a través de material de propagación infectado e injertos y no tiene vectores asociados.

3.1.3. Complejo rugoso de la madera

Esta enfermedad se consideró por muchos años como un trastorno de la vid basado en síntomas evidenciados en los hospederos diferenciales *V. rupestris*, LN33 y Kober 5BB; los cuales manifestaban cuatro síndromes bien característicos: Picadura del tallo de Rupestris (RSP), Ranurado del tallo de Kober (KSG), Corteza corchosa (CB) y Ranurado del vástago LN-33 (LNSG).

En la década de los 80, Conti *et al.* (1980) visualizaron partículas virales, lo que permitió establecer la etiología de la enfermedad. Actualmente, se conoce que en el Complejo rugoso de la madera participan seis agentes causales: Grapevine virus A, Grapevine virus B, Grapevine virus D, Grapevine virus E, Grapevine virus F y Grapevine rupestris stem pitting associated virus. Los cinco primeros pertenecen al género *Vitivirus* y el último al género *Foveavirus*. Estos virus pueden generar cuatro síndromes, tal como se muestra en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Síndromes del Complejo rugoso de la madera, virus asociados y hospederos diferenciales.

Virus	Síndrome	Hospedero diferencial
GRSPaV	Picadura del tallo de Rupestris (Rupestris stem pitting, RSP)	<i>Vitis rupestris</i> St. George
GVA	Ranurado del tallo de Kober (Kober stem grooving, KSG)	Kober 5BB
GVB	Corteza corchosa (Corky bark, CB)	<i>Vitis rupestris</i> y LN-33
No hay virus asociado	LN-33 Stem Grooving	LN-33
GVD	Corteza corchosa (Corky bark, CB)	No hay descrito
GVE	No hay evidencia de relación con un síndrome	No hay descrito
GVF	No hay evidencia de relación con un síndrome	No hay descrito

La enfermedad del Complejo de la madera rugosa es una de las más importantes de la vid, pues tiene un impacto económico significativo en la industria de esta fruta en todo el mundo (Orfanidu *et al.*, 2021). Los síntomas pueden ser muy severos, especialmente en plantas injertadas que manifiestan un abultamiento en la zona de la unión patrón-injerto. La sintomatología también se puede manifestar en la corteza, ya sea en la variedad o en el portainjerto, mostrando un cambio en la textura y aspecto de ésta que pasa a ser corchosa, esponjosa, gruesa, de aspecto áspero y presencia de ranuras. En otros casos los síntomas pueden pasar desapercibidos, pues se manifiestan como menor vigor, brotación retrasada o enanismo en las plantas. Este complejo se disemina principalmente mediante material de propagación e injertos infectados. Además, los virus GVA y GVB son transmitidos por vectores como el chanchito blanco (*Pseudococcus longispinus*) (Cuadro 2.1).

En Chile están presentes tres de los seis agentes causales de esta enfermedad, los cuales son: GVA, GVB y GRSPaV (Cuadro 3.1). No obstante, la literatura nacional no reporta la observación de la sintomatología severa que estos virus provocan en otras partes del mundo. Fiore *et al.* (2008) señalan en su trabajo que esta situación se debe posiblemente a que en Chile los viñedos antiguos fueron establecidos en pie franco, sin embargo, los autores observaron síntomas correspondientes a necrosis de venas que asociaron a la presencia de GRSPaV.

3.1.4. Fleck

Esta enfermedad tiene cuatro virus que actúan como agente causal, siendo el principal Grapevine fleck virus (GFkV), perteneciente a la familia *Tymoviridae*, género *Maculavirus* (Cuadro 2.1). Las otras tres especies virales corresponden a Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV) y Grapevine red globe virus (GRGV) (Cuadro 3.1). Esta enfermedad está presente en todas las zonas en donde se cultiva la vid, sin embargo, según evidencia la literatura, aparentemente no causa pérdidas económicas. Al contrario, Mannini *et al.* (2012) observaron en un ensayo diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos de dos grupos de plantas: el primero, compuesto por plantas infectadas con GFkV y sanas, obtuvo rendimientos altos, mientras que el segundo, formado por plantas infectadas con otros virus, presentó rendimientos bajos.

A la fecha no se conoce un vector asociado a su diseminación, no obstante, la infección se transmite fácilmente de una planta a otra a través de injertos o propagación de estacas procedentes de una planta enferma. Esta enfermedad es considerada como latente, ya que generalmente no provoca síntomas, salvo algunas excepciones como en *Vitis rupestris* St. George donde causa aclaramiento de venas, deformación de hojas y reducción del crecimiento vegetativo (Fajardo *et al.*, 2012; Martelli, 2014). De los cuatro virus que causan esta enfermedad en Chile sólo se ha determinado la presencia de GFkV (Fiore *et al.*, 2008).

3.1.5. Enfermedades emergentes presentes en Chile

Las enfermedades emergentes son aquellas patologías cuyos agentes causales no se conocían con anterioridad y cuya incidencia ha aumentado en las últimas décadas. En el caso de las vides, se pueden mencionar muchas especies virales que han surgido en los últimos años, especialmente gracias a las tecnologías de secuenciamiento de alto rendimiento (HTS). En Chile sólo se han determinado dos de ellas: Grapevine pinot gris virus (GPGV) y Grapevine syrah virus-1 (GSyV-1) (Cuadro 3.1). GPGV es parte de la familia *Betaflexiviridae*, género *Trichovirus* (Cuadro 2.1) y se encuentra presente en varias regiones en donde se cultiva la vid. Este virus es el causante de la enfermedad Moteado y deformación de las hojas de la vid, cuya sintomatología corresponde a distorsión y moteado de la hoja, brotación retrasada, entrenudos de brotes cortos, aumento de la acidez de las bayas y bajo rendimiento, los cuales son más evidentes en primavera y menos al final de la temporada. Muchas veces el virus puede estar presente sin que la planta manifieste síntomas. El vector de GPGV es la araña *Colomerus vitis*, pero también puede transmitirse mediante injertos. En Chile, hasta la fecha solo existe un reporte en donde se determinó en forma aislada en un clon de *Vitis vinífera* (Zamorano *et al.*, 2019).

Por su parte, GSyV-1 pertenece a la familia *Tymoviridae*, género *Marafivirus* (Cuadro 2.1). Fue determinado en el año 2009 en plantas que manifestaban declinamiento de Syrah (Rwahnih *et al.*, 2009), sin embargo, estudios posteriores han demostrado que no hay una asociación exacta entre esta enfermedad y un virus en particular (Xiao *et al.*, 2023). La diseminación del GSyV-1 ocurre mediante saltamontes que actúan como vectores (Rwahnih *et al.*, 2009). En Chile fue identificado puntualmente en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins (Engel *et al.*, 2010b) y a la fecha no existen nuevos reportes ni estudios de prevalencia.

3.2. Prevalencia de los principales virus que afectan la vid

Con el objetivo de conocer el porcentaje de infección con virus en un grupo de plantas de vid, se recopiló información de análisis virológicos realizados en el Laboratorio de Virología de INIA La Platina, entre los años 2015 a 2024, utilizando la técnica molecular Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction).

En total se analizaron 1.021 muestras colectadas entre las regiones de Coquimbo y del Libertador Bernardo O'Higgins, para determinar la presencia de los virus GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GRSPaV, GFKV y ArMV, que son los de mayor interés para productores de uva de mesa y vinífera. Cada muestra consideró material vegetal de sólo una planta. Para la extracción de los ácidos nucleicos totales (TNAs) de cada una de las muestras, se siguió la metodología descrita por Foissac *et al.* (2001). Esta extracción se realizó desde tejido floemático, el cual se obtuvo mediante un raspado de los sarmientos verdes. Para los análisis de PCR, que incluyen una transcripción reversa (RT) debido a que el material genético del virus es ARN, se utilizaron los partidores descritos en el Cuadro 3.4. La metodología de RT y PCR se detalla en el Capítulo 4 de este libro.

Los resultados evidenciaron que el 74,1 % de las muestras presentaban infección con uno o más virus, siendo el más prevalente GRSPaV con un 56,4 % del total de las plantas analizadas, seguido de GVA con un 36,7 % y GFLV con un 33,7 %. Los virus que presentaron la menor prevalencia fueron ArMV, GFKV y GVB con un 0,2 %; 3,8 %; y 4%, respectivamente (Figura 3.16). En las muestras analizadas se encontraron mayormente infecciones simples, es decir, con un solo virus, sin embargo, también se presentaron mezclas de infecciones que contemplaron entre dos a siete virus (Figura 3.17).

Cuadro 3.4. Partidores específicos utilizados para la identificación de virus.

Virus	Nombre	Secuencia 5' -> 3'	Tamaño	Referencia
GFLV	FL-Forward FL-Reverse	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT GAAGGTATGCTCTTCAGTGG	118 pb	Gambino G. and Gribaudo I. (2006)
GLRaV-1	LR1-F LR1-R	TCTTTACCAACCCGAGATGAA GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	232 pb	Gambino G. and Gribaudo I. (2006)
GLRaV-2	V2dCPf2 V2CPrl	ACGGTGTGCTATAGTGCCTG GCAGCTAAGTACGAATCTTC	515 pb	Bertazzon, N., and Angelini, E. (2004)
GLRaV-3	LR3-F LR3-R	TACGTTAAGGACGGGACACAGG TGCGGCATTAATCTTCATTG	336 pb	Gambino G. and Gribaudo I. (2006)
GVA	GVA6591F GVA6862R	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA TCGAACATAACCTGTGGCTC	272 pb	Goszczynski, D., and Jooste, A. (2003)
GVB	GVB-H6980 GVB-C7439	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC ATCAGCAAACACGCTTGAACCG	460 pb	Stewart S. and Nassuth A. (2001)
GRSPaV	Rup-F Rup-R	GGGTGGGATGTAGTAACCTTTGA GCAAGTGAATGAAAGCATCACT	155 pb	Gambino G., and Gribaudo I. (2006)
GFKV	Fleck-F Fleck-R	TGACCAGCTGCTGTCTCTA TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	179 pb	Gambino G., and Gribaudo I. (2006)
ArMV	ArMV-F ArMV-R	ATGCTGATGTTGGAGTTGCTCT AGTGGCACTAAACCACAAAGC	416 pb	Gambino G. (2015)

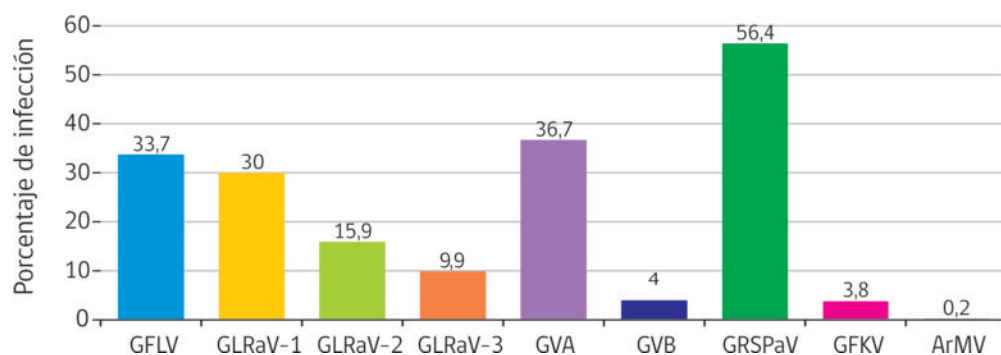


Figura 3.16. Porcentaje de plantas de vides infectadas con cada virus en el total de muestras analizadas.

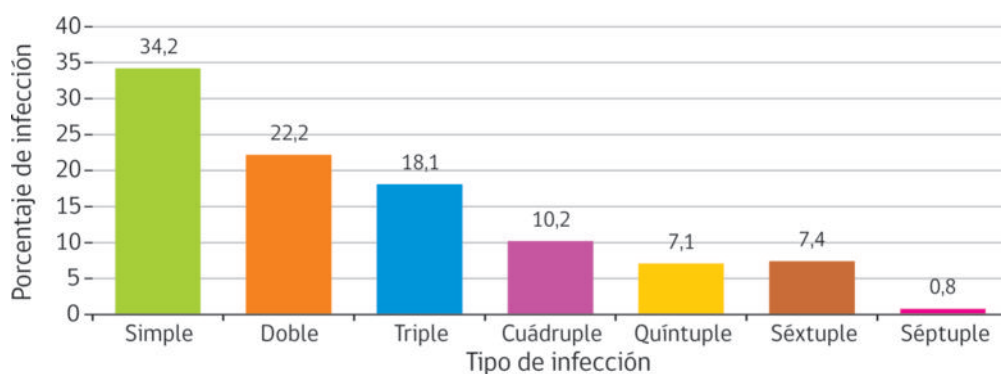


Figura 3.17. Porcentaje de muestras en que se identificaron mezclas de infecciones, considerando la presencia desde uno hasta siete virus.

3.3. Bibliografía

- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., & Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86(3), 183–195. <http://www.jstor.org/stable/41992424>
- Atallah, S. S., Gómez, M. I., Fuchs, M. F., y Martinson, T. E. (2011). Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 63(1), 73–79. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11055>
- Auger S., Jaime, Esterio G., Marcela (Abr–Jun 1998). Las enfermedades a virus de la vid: sintomatología, principales formas de transmisión y efectos en la producción y calidad de la uva y sus productos [en línea]. *Aconex*. (no.59) p. 5–13. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/39501>
- Auger S., Jaime, Aballay E., Erwin, Pinto G., Manuel, Pastenes V., Claudio (Oct–Dic 1994). Efectos del virus de la hoja en abanico (VHA) en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson Seedless [en línea]. *Aconex* (no. 46) p. 20–23. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/47904>
- Bertazzon, N., y Angelini, E. (2004). Advances in the detection of Grapevine leafroll-associated virus 2 variants. *Journal Of Plant Pathology*, 86(4), 283–290. <http://www.jstor.org/stable/41998982>
- Cereceda, C., y Auger, J. (1979). Aislamiento y caracterización del virus del mosaico amarillo de la vid (*Vitis vinifera* L. cv. Semillon) presente en Chile. *Investigación Agrícola*, 5(2), 83–88. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/44861>
- Cieniewicz, E., Fuchs, M. F. (2015). Grape leaf roll disease. IMP integrated pest management. Grapes. Cornell University. <https://hdl.handle.net/1813/43103> (Consultado 20–Diciembre–2010)
- Conti, M., Milne, R.G., Luisoni, E., y Boccoardo, G. (1980). A closterovirus from a stem-pitting-diseased grapevine. *Phytopathology*, 70(5), 394–399. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-394>
- Demangeat, G., Voisin, R., Minot, J.-C., Bosselut, N., Fuchs, M., y Esmenjaud, D. (2005). Survival of *Xiphinema* index in vineyard soil and retention of Grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95, 1151–1156. <https://doi.org/10.1094/phyto-95-1151>
- Digiario, M., Elbeaino, T., y Martelli, G.P. (2017). Grapevine fanleaf virus and Other Old World Nepoviruses. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 47–82). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_3
- Engel, E.A., Escobar, P., Montt, C., Gómez-Talquenca, S., y Valenzuela, P.D.T. (2008). First Report on the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 7 and 9 in Chilean Grapevines. *Plant Disease*, 92(8), 1252–1253. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-8-1252c>
- Engel, E.A., Escobar, P.F., Rivera, P.A., y Valenzuela, P.D.T. (2010a). First report on the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 5 in Chilean grapevines. *Plant Disease*, 94(8), 1067. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-8-1067a>
- Engel, E.A., Rivera, P.A., y Valenzuela, P.D.T. (2010b). First report of Grapevine Syrah virus-1 in Chilean grapevine. *Plant Disease*, 94(5), 633. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-5-0633a>

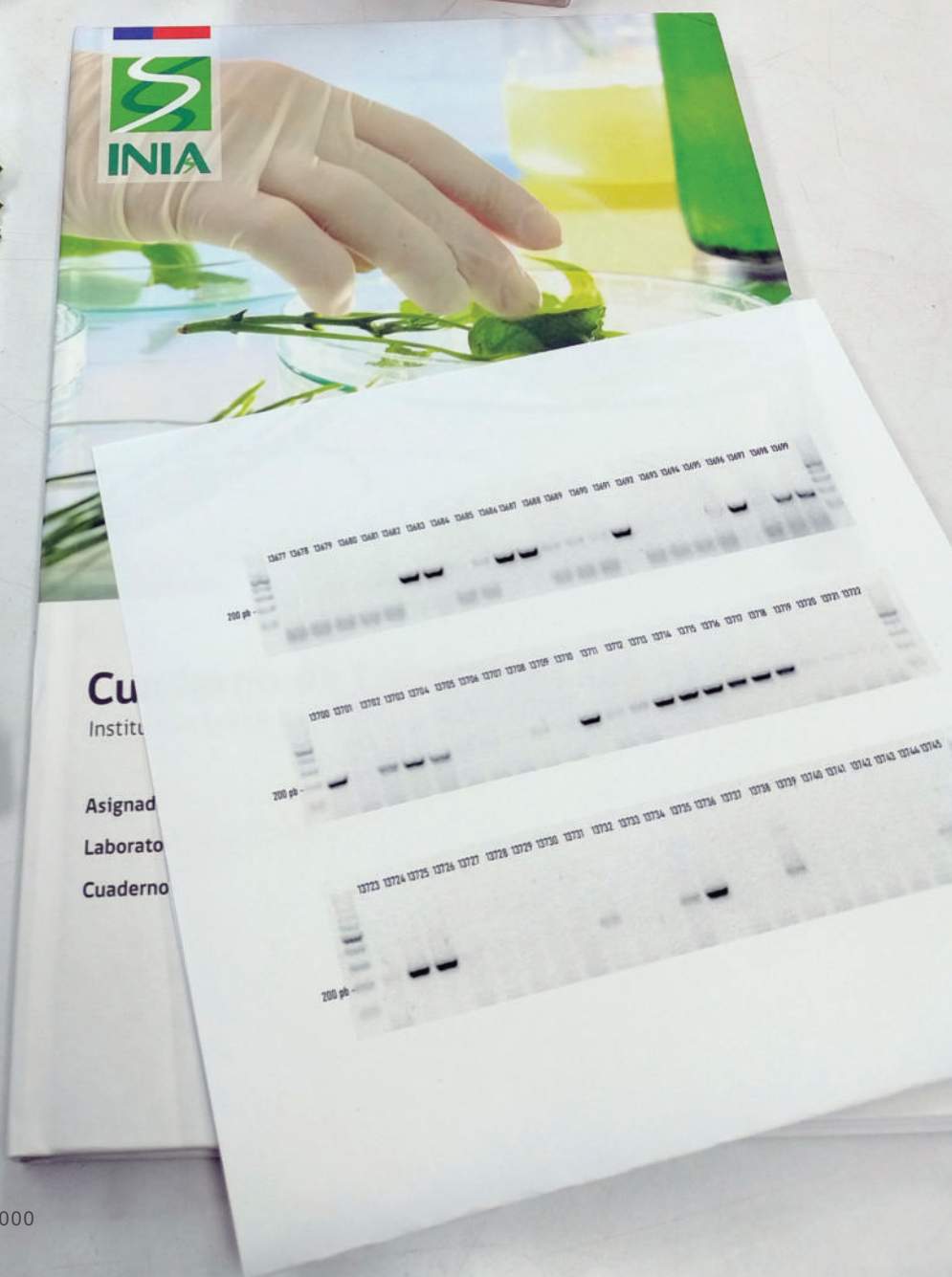
- Escobar P.F., Fiore N., Valenzuela P.D.T., y Engel E.A. (2008). First Detection of Grapevine leafroll-associated virus 4 in Chilean Grapevines. *Plant Disease*, 92(10), 1474. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-10-1474c>
- Fajardo, T.V.M., Eiras, M., Nickel, O., Dubiela, C.R., y de Souto, E.R. (2012). Detection and partial molecular characterization of Grapevine fleck virus, Grapevine virus D, Grapevine leafroll-associated virus -5 and -6 infecting grapevines in Brazil. *Ciência Rural*, 42(12), 2127-2130. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782012005000119>
- Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A., y Zamorano, A. (2008). Survey of Grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 90, 125-130. <http://www.jstor.org/stable/41998470>
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M. J., Candresse, T., y Gentit, P. (2001). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550, 37-44. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2001.550.2>
- Gambino, G. (2015). Multiplex RT-PCR Method for the Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses. En *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1236. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_4
- Gambino, G., y Gribaudo, I. (2006). Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology*, 96(11), 1223-1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>
- Greif C., Garau R., Boscia D., Prota V.A., Fiori M., Bass P., Walter B., y Prota U. (1995). The relationship of grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 34(3), 167-173. <http://www.jstor.org/stable/42685224>
- Goszczynski, D., y Jooste, A. (2003). Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 397-403. <https://doi.org/10.1023/A:1023555018700>
- Herrera, G., y Madariaga, M. (1994). Detección de los virus Tomato ringspot virus y Arabis mosaic virus en vides en Chile. *Fitopatología*, 44(1), 42-44.
- Herrera, M., G. (2000). Sanidad Vegetal Virus. En *Uva de Mesa en Chile* (pp. 289-297)
- Madariaga, M., Sandoval, C. y Moreno Y. (1998). Presencia e identificación de enfermedades de naturaleza viral en viñedos de la Zona Central de Chile I: TomRSV, TRSV, RRV, SLRV. Talca, Chile: Universidad de Talca. Disponible en <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/553>
- Mannini, F., Mollo, A., Santini, D., Gambino, G., y Tragni, R. (2012). Field Performances and Wine Quality Modification in a Clone of 'Nebbiolo' (*Vitis vinifera* L.) after Grapevine Fleck Virus Elimination. *Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA:156-157*. Disponible en <https://ucanr.edu/sites/ICVG/files/156711.pdf>
- Martelli, G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 1-136. <https://doi.org/10.4454/jpp.v96i1sup>
- Martelli, G.P. (2017). An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. (pp. 31-46). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_2

- Orfanidou, C.G., Moraki, K., P. Panailidou, P., Lotos, L., Katsiani, A., Avgelis, A., Katis, N.I., y Maliogka, V.I. (2021). Prevalence and Genetic Diversity of Viruses Associated with Rugose Wood Complex in Greek Vineyards. *Plant Disease*, 105 (11), 3677–3685. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-21-0266-re>
- Ricketts, K.D., Gomez, M.I., Atallah, S.S., Fuchs, M.F., Martinson, T.E., Battany, M.C., Bettiga, L.J., Cooper, M.L., Verdegaal, P.S., y Smith, R.J. (2015). Reducing the Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease in California: Identifying Optimal Disease Management Strategies. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(2), 138–147. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14106>
- Rwahnih, M. A., Daubert, S., Golino, D., y Rowhani, A. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387(2), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028>
- Sánchez C., Reinaldo R (1995). Prospección de nepovirus y closterovirus en zonas vitivinícolas de la VIII región [Grapevine Fanleaf Virus, Grapevine Leafroll, Arabis Mosaic Virus, Cherry Leafroll Virus] [en línea]. Chillán, Chile: Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/53458> (Consultado: 22 de noviembre de 2024).
- Sanfaçon, H. (2021). Nepoviruses (Secoviridae). En *Encyclopedia of Virology* (Fourth Edition) (pp. 486–494). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21251-X>
- Servicio Agrícola y Ganadero (2014). Modifica resolución 981, de 2011, que establece normas para viveros y depósitos de plantas. <https://normativa.sag.gob.cl/Publico/Normas/DetalleNorma.aspx?id=1071608>
- Servicio Agrícola y Ganadero (2021). Establece lista de plagas no cuarentenarias reglamentadas para material de propagación de vid y las medidas fitosanitarias obligatorias para su supresión. <https://normativa.sag.gob.cl/Publico/Normas/DetalleNorma.aspx?id=1162396>
- Stewart S. y Nassuth A. (2001): RT-PCR Based Detection of Rupestris stem pitting associated virus Within Field-Grown Grapevines Throughout the Year. *Plant Disease*, 85(6), 617–620. <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.6.617>
- Valenzuela B., J. (1973) Hoja en abanico de la vid [en línea]. Santiago, Chile: Investigación y Progreso Agrícola. v.5(1) p. 52. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/30884>
- Vega, A., Gutiérrez, R.A., Peña-Neira, A., Cramer, G.R., y Arce-Johnson, P. (2011). Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology*, 77(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9807-8>
- Xiao, H., Roscow, O., Hooker, J., Li, C., Maree, H.J., y Meng, B (2023). Concerning the Etiology of Syrah Decline: A Fresh Perspective on an Old and Complex Issue Facing the Global Grape and Wine Industry. *Viruses*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.3390/v15010023>
- Zamorano, A., Medina, G., Fernández, C., Cui, W., Quiroga, N., y Fiore, N. (2019). First Report of Grapevine Pinot gris virus in Grapevine in Chile. *Plant Disease*, 103(6), 1438. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-18-1855-pdn>

Diagnóstico de virus en vides

Capítulo

4



Diagnóstico de virus en vides

Isabel Ramírez A.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

En las últimas décadas, el diagnóstico de virus en los cultivos ha experimentado una transformación notable gracias a la disponibilidad de diversas técnicas de laboratorio. Esta evolución ha permitido a los productores acceder a herramientas más precisas y eficientes para la detección de patógenos, lo que impacta positivamente en la calidad y productividad de sus cosechas. La disponibilidad de diversas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de virus en vides ofrece una serie de beneficios para los productores, como mayor precisión y sensibilidad en la detección de patógenos, análisis más rápidos y eficientes, posibilidad de realizar análisis en diferentes etapas del ciclo productivo y toma de decisiones más precisas para el manejo de las enfermedades virales. La identificación temprana de virus en los cultivos es fundamental para implementar a tiempo medidas de control efectivas, evitar la propagación del virus a otras plantas y minimizar las pérdidas económicas.

La selección de la técnica adecuada y la detección temprana de patógenos son claves para asegurar la calidad y productividad de la producción agrícola. Esta selección depende de diversos factores, como el tipo de patógeno a evaluar, el presupuesto disponible y la infraestructura y el personal capacitado del laboratorio. Una de las primeras metodologías utilizadas para el diagnóstico de virus ha sido la indexación biológica, que ha sido empleada durante décadas para el diagnóstico de enfermedades virales en vides. Otras metodologías son del tipo serológico y durante los últimos años han mostrado mayor protagonismo los métodos moleculares.

4.1. Indexación biológica

La indexación biológica es una técnica de diagnóstico fitopatológico que aprovecha la sensibilidad de ciertas plantas, conocidas como indicadoras, para detectar la presencia de patógenos, especialmente virus. Al inocular un patógeno sospechoso en una planta indicadora susceptible, se induce la expresión de síntomas característicos, tales como mosaicos, enanismo, deformaciones foliares o necrosis, que son específicos para cada patógeno. Estos síntomas evidencian la infección y permiten la identificación del agente causal.

Para identificar los virus que afectan el cultivo de la vid, existen dos enfoques principales en el indexado: utilizando plantas herbáceas o utilizando plantas leñosas como indicadores.

4.1.1. Indexado con plantas herbáceas

En el caso del indexado con plantas herbáceas, se puede detectar virus que puedan ser transmitidos mecánicamente a través de la savia. Los principales virus que pueden ser evaluados mediante esta

técnica son nepovirus, tales como: *Nepovirus arabis* (Arabis mosaic virus, ArMV), *Nepovirus foliumflabelli* (Grape fanleaf virus, GFLV), *Nepovirus rubi* (Raspberry ringspot virus, RRSV), *Nepovirus nicotianae* (Tobacco ringspot virus, TRSV), *Nepovirus lycopersici* (Tomato ringspot virus, ToRSV) y otros virus como *Stralarivirus fragariae* (Strawberry latent ringspot virus, SLRV) (Rowhani et al., 2017). Para estos ensayos se utilizan plantas herbáceas indicadoras como *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana clevelandii* y *Cucumis sativus* (Roy y Fuchs, 2022).

Para el procedimiento de transmisión de virus con savia, se utilizan brotes u hojas jóvenes de las vides a analizar y son homogeneizados en un tampón fosfato que contiene nicotina o polivinilpirrolidona. Estas sustancias neutralizan los efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos u otros presentes en la vid, facilitando de este modo la transmisión del virus. Antes de colocar el homogeneizado en las plantas indicadoras, se espolvorea un abrasivo como el carburo de silicio en sus hojas y cotiledón. Luego se aplica suavemente el homogeneizado, el cual se debe enjuagar al finalizar el procedimiento para prevenir posibles daños causados por la sobreexposición a los compuestos químicos. Las plantas indicadoras se deben mantener en invernadero con ambiente controlado y, después de unos días, si se ha producido la transmisión viral, mostrarán los primeros síntomas (Figura 4.1). Posteriormente se presentan síntomas sistémicos como mosaicos, aclaramiento de venas, deformaciones, necrosis apical, anillos necróticos u otros, dependiendo de la planta receptora y el virus transmitido, obteniendo estos resultados en cuestión de semanas (Legrand, 2015).

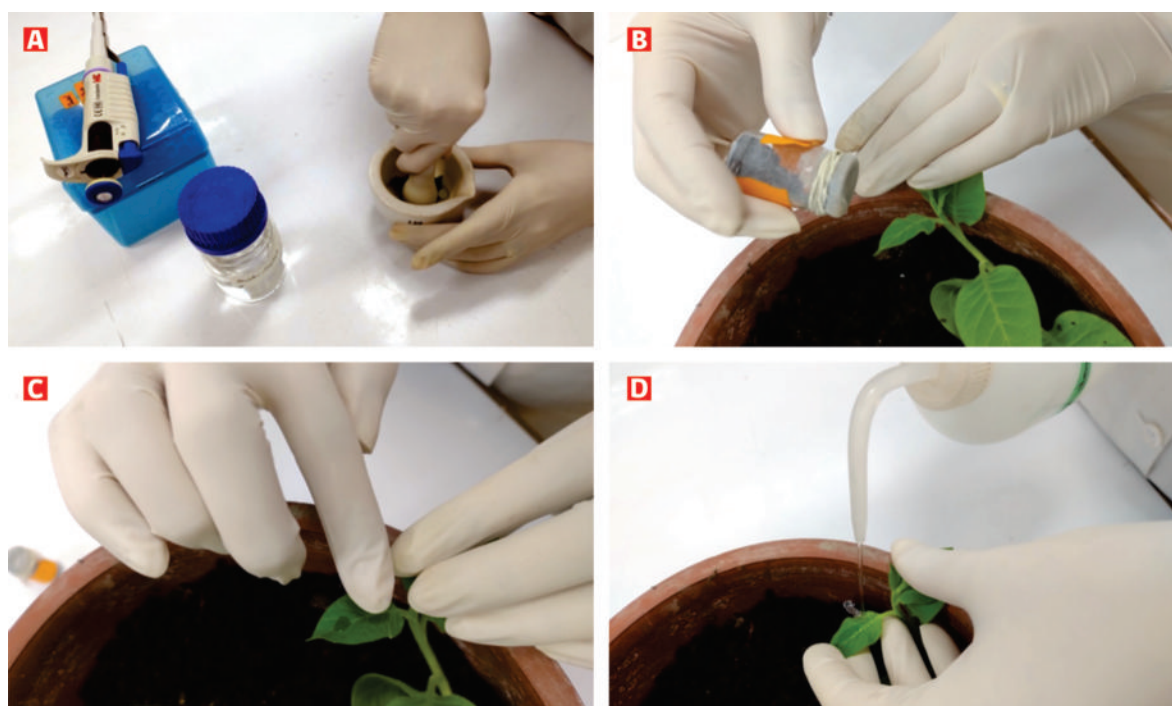


Figura 4.1. Pasos para realizar indexación biológica en plantas herbáceas para diagnóstico de virus. A: Homogenización de hojas a analizar en tampón fosfato. B: Aplicación de carburo de silicio. C: Aplicación de homogenizado. D: Enjuague.

4.1.2. Indexado con plantas leñosas

No todos los virus son transmisibles a través de la savia, sino que existen algunos virus que afectan a las vides que se encuentran restringidos al floema (Bendix y Lewis, 2017). En estos casos se puede utilizar otra aproximación mediante el uso de injerto de astilla en indicadores leñosos, como *Vitis rupestris* St. George,

LN33 (1613 Couderc x *V. vinifera* cv. Thompson seedless), Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) y Cabernet Franc. En el Cuadro 4.1 se resumen los indicadores recomendados y los síntomas asociados a cada virus (Rowhani *et al.*, 2017).

Cuadro 4.1. Indicadores leñosos recomendados y síntomas asociados a cada virus de vides. Con “X” se señala indicadores que NO deben ser utilizados para el análisis del virus correspondiente y en blanco se muestran los indicadores no descritos para el virus.

Nombre del virus	Indicador			
	<i>Vitis rupestris</i> St. George	LN33	Kober 5BB	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Franc
Grape fanleaf virus (GFLV)	Aclaramiento de venas, anillos cloróticos, entrenudos cortos, entre otros			
Grapevine fleck virus (GFKV)	Aclaramiento de venas y puntos localizados traslúcidos			
Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)	Marcas en el tallo que se extienden hacia abajo del sitio del injerto	X	X	
Grapevine virus B (GVB)	X	Surcos y hendiduras en el cilindro leñoso, fisuras en la corteza del tronco, hojas rojas y formación de callos esponjosos	X	
Grapevine virus A (GVA)	X	X	Necrosis de la madera, hendiduras y surcos	
Grapevine leaf roll associated virus 1,2,3,4 (GRRaV-1,2,3,4)				Enrojecimiento de las hojas con venación verde (excepto en GLRaV-2 strain Redglobe y GLRaV-7 los cuales son asintomáticos en este indicador)

Para realizar estos injertos, las plantas indicadoras se hacen crecer en invernadero hasta alcanzar una altura suficiente para ser injertadas (generalmente 25-30 cm y un diámetro de 3-4 mm). Se suelen injertar 2-3 fragmentos del mismo inóculo por planta indicadora.

Las plantas se podan ligeramente por encima del injerto superior unas semanas después de la operación con el fin de promover el desarrollo de nuevos brotes, ya que estos son más susceptibles a mostrar síntomas. La supervivencia del tejido injertado indica el éxito del procedimiento (Legrand, 2015). El método mediante indicadores leñosos es un proceso lento, pues a diferencia del indexado de plantas herbáceas que lleva de tres a cuatro semanas, éste puede requerir hasta tres años para completarse. La injertación se debe realizar a fines del invierno e inicios de primavera y se deben mantener en invernadero, para sólo ser trasplantadas a condiciones ambientales cuando se confirma la correcta unión del injerto. La evaluación de los síntomas se realiza en primavera y otoño durante dos a tres temporadas.

Una variante para disminuir los tiempos de espera del método convencional es la indexación *in vitro* por microinjerto. A diferencia del método tradicional, el microinjerto *in vitro* se realiza en condiciones asépticas, utilizando injertos y plantas indicadoras de tamaño reducido obtenidos mediante cultivo de tejidos. Además, no es necesario un sistema radicular bien establecido para realizar el microinjerto. Por otra parte, el cultivo *in vitro* puede evitar la interferencia de factores ambientales, como la temperatura, la luz, la nutrición y la presencia de otros patógenos, lo que garantiza la fiabilidad de los resultados, además de su eficiencia en términos de tiempo (Hao *et al.*, 2017).

En 1993, Tanne y cols., realizaron el indexaje *in vitro* para la detección de corky bark, desarrollando los síntomas en la planta indicadora entre 8-12 semanas. Este método también fue utilizado por Pathirana y McKenzie (2005) para la determinación de *Ampelovirus trivitis* (Grapevine leafroll-associated virus-3, GLRaV-3). Dado que los síntomas asociados a los virus del enrollamiento de la vid se adelantan e intensifican en plantas sometidas a estrés hídrico, en los medios de cultivo se pueden agregar aditivos que simulen este estrés, lográndose observar síntomas hasta cuatro semanas después de iniciado éste (Hao *et al.*, 2021).

Actualmente, la indexación biológica ya no es muy utilizada, pues ha sido reemplazada por otras técnicas más rápidas, sensibles y económicas; sin embargo, aún resulta una técnica muy útil en casos de nuevos virus sin caracterizar.

4.2. Métodos serológicos

Esta metodología está basada en el reconocimiento de antígenos virales utilizando anticuerpos específicos. Existen variados métodos en que se pueden ocupar antígenos, siendo el más reconocido la prueba ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) que, en el caso de los virus de plantas, ocupa anticuerpos específicos para proteínas de la cápside viral. Los anticuerpos más comúnmente usados son del tipo policlonal. Para su producción se utilizan animales como conejos, ovejas y cabras, los que son inyectados con un virus parcial o totalmente purificado (antígeno), que es reconocido por diferentes linfocitos B. De este modo se producen diversos anticuerpos que son capaces de identificar múltiples epítomos del mismo antígeno, otorgando así mayor sensibilidad a cambio de una menor especificidad. En cambio, para la producción de anticuerpos monoclonales se utilizan generalmente roedores, siendo estos anticuerpos producidos por un solo clon de linfocitos B, reconociendo así un solo epítomo de un antígeno, lo cual le otorga una alta especificidad; no obstante, este tipo de anticuerpos son más lentos y caros de elaborar.

4.2.1. DAS-ELISA

Existen diversos formatos del test ELISA, siendo el más común el de tipo DAS (Double Antibody Sandwich), cuyo primer paso consta del recubrimiento de la placa ELISA, que comúnmente es de poliestireno, con un primer anticuerpo específico para el virus a diagnosticar. En esta etapa habitualmente se utiliza un tampón carbonato pH 9,6 y requiere que el anticuerpo sea incubado a una temperatura controlada de 37 °C o durante toda la noche a 4 °C, teniendo siempre la precaución de sellar la placa durante la incubación para prevenir la evaporación de las soluciones.

Como segundo paso, se elimina el exceso de anticuerpo mediante un lavado de la placa, que se realiza con un tampón fosfato que contenga un dispersante como Tween-20. Posteriormente se coloca el antígeno (extracto de la planta de vid a analizar macerada con tampón fosfato), permitiendo su unión al anticuerpo adherido a la placa mediante una nueva incubación a 4 °C durante toda la noche. La placa es

lavada nuevamente, para luego colocar un segundo anticuerpo específico que se encuentra conjugado a una proteína, habitualmente fosfatasa alcalina, y a través de una incubación a 37 °C se permite su unión al antígeno.

Finalmente, tras un nuevo ciclo de lavado de la placa, se agrega el sustrato que generará la coloración para la detección del virus. Generalmente, el sustrato utilizado es p-nitrofenilfosfato, el cual en presencia de la enzima fosfatasa alcalina (conjugada al segundo anticuerpo) es desfosforilado a un compuesto de color amarillo llamado p-nitrofenol, coloración que puede ser medida utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Si los extractos de las plantas no se encuentran infectados con el virus analizado, no ocurre la unión del segundo anticuerpo y será lavado fuera de la placa, por ende, tampoco se encontrará la enzima fosfatasa alcalina y, al agregar el sustrato, no se producirá la coloración amarilla. Por el contrario, si la muestra estaba infectada, se producirá la unión del segundo anticuerpo al antígeno (unión que permanecerá pese a los lavados) y al colocar el sustrato se producirá la coloración amarilla, mostrando de este modo la presencia de infección (Figura 4.2).

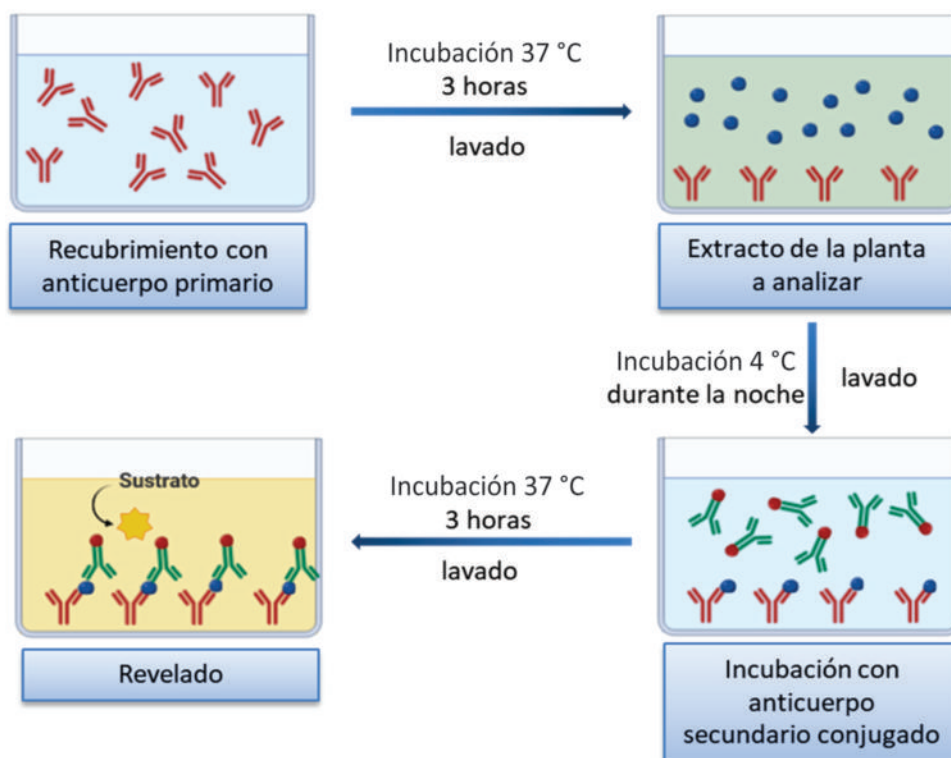


Figura 4.2. Esquema de las etapas de DAS-ELISA. En rojo anticuerpo primario, esfera azul simboliza el antígeno, en verde anticuerpo secundario conjugado, esfera roja simboliza la enzima fosfatasa alcalina.

4.2.2. TAS-ELISA

Existen otras variantes de la prueba ELISA, como el TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich) en el cual el segundo anticuerpo (específico para el antígeno) no está conjugado a una proteína, sino que existe un tercer anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina, el que no es específico para el virus, sino que reconoce y se une al segundo anticuerpo. El tipo de tercer anticuerpo a utilizar dependerá de la especie huésped del anticuerpo secundario que se utilizó, por ejemplo, si el anticuerpo secundario policlonal se produjo

en cabra, necesitará un anticuerpo terciario anti-IgG de cabra creado en una especie diferente. Al igual que el test ELISA anterior, la presencia de antígeno viral en la muestra se indicará por la formación de una coloración amarilla al colocar el sustrato (Figura 4.3).

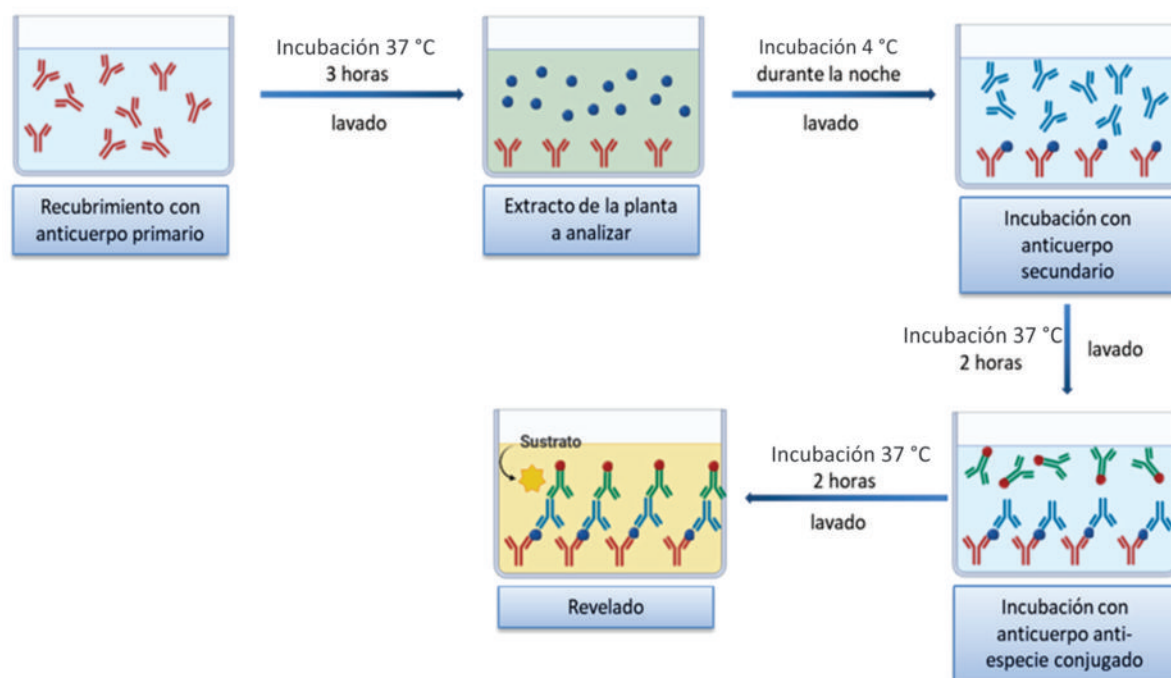


Figura 4.3. Esquema de las etapas de TAS-ELISA. En rojo anticuerpo primario; círculo azul simboliza el antígeno; en azul, anticuerpo secundario; y en verde, anticuerpo terciario conjugado; círculo rojo simboliza la enzima fosfatasa alcalina.

4.2.3. ELISA indirecto

Otra variante, menos utilizada en el caso de las vides, es el ELISA indirecto. En este, se comienza recubriendo la placa con el antígeno (extracto de vid), para posteriormente colocar el anticuerpo específico y finalmente colocar un segundo anticuerpo anti-especie conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, que reconocerá el primer anticuerpo (Figura 4.4). Así, en este tipo de test, solo un anticuerpo es específico para el virus. Aunque el ELISA indirecto es más sencillo tiene como principal desventaja la reactividad cruzada, aumentando las posibilidades de señales no específicas. En cambio, los ELISA tipo Sandwich (DAS y TAS) son altamente específicos y sensibles, debido a que son dos anticuerpos los que capturan y se unen al antígeno.

En Chile, en la actualidad, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) tiene un instructivo técnico para la certificación de plantas frutales y certificación fitosanitaria de exportación y diagnóstico de plagas no cuarentenarias reglamentadas (PNCR), que indica cuáles son los proveedores de anticuerpos aceptados para los análisis ELISA, admitiéndose para los virus GLRaV-1, 2 y 3, GFLV, GVA, TRSV, ArMV, y SLRSV los anticuerpos de marca Bioreba. Para el caso del virus ToRSV se pueden utilizar anticuerpos marca Bioreba o Agdia y para el virus GVB de la marca Agritest (ELISA indirecto) (SAG, 2023).

Entre las ventajas de la prueba ELISA versus los métodos moleculares es que es menos probable que ocurra una contaminación, su realización es sencilla, no necesita un procesamiento complejo de la muestra, ya que no se ve afectado por inhibidores como en el caso de la PCR y el equipamiento necesario

no es de alto costo, por lo que resulta muy útil para analizar grandes cantidades de muestras. Por otro lado, entre las desventajas de las pruebas serológicas se debe considerar que la detección de los virus está limitada a la disponibilidad de anticuerpos comerciales. Además, tiene una menor sensibilidad en comparación con métodos moleculares, por lo que pueden ocurrir falsos negativos en mayor grado, por este motivo, se recomienda utilizarlas en épocas del año en que se encuentra mayor título viral.

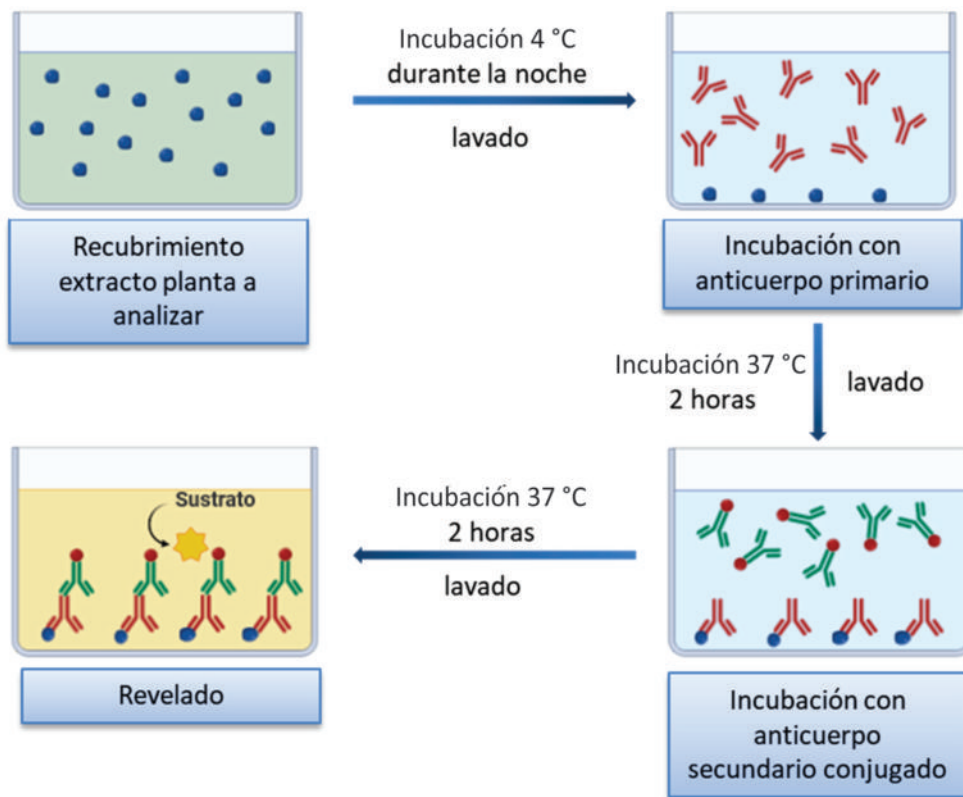


Figura 4.4. Esquema de las etapas del ELISA indirecto. Esfera azul simboliza el antígeno, en rojo anticuerpo primario, en verde anticuerpo secundario conjugado, esfera roja simboliza la enzima fosfatasa alcalina.

4.3. Métodos moleculares

4.3.1. PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica de laboratorio que permite amplificar de forma exponencial una secuencia específica del material genético viral para su detección. Esto significa que, a partir de una pequeña cantidad de material genético viral presente en una muestra, se pueden generar millones de copias, lo que facilita su detección. En el caso de los virus que afectan a la vid, este material genético puede consistir en ADN (ácido desoxirribonucleico), como ocurre en el caso de *Grabovirus vitis* (Grapevine red blotch virus, GRBaV), o bien, como en la mayor parte de los virus que afectan a la vid, en ARN (ácido ribonucleico). Para este último tipo de virus, se debe realizar un paso previo al PCR, denominado transcripción reversa (RT) mediante la cual se sintetiza una hebra complementaria al ARN, formando de este modo ADN complementario (ADNc), y este ADNc es utilizado de molde para continuar con la amplificación.

Para la detección confiable de los virus, un primer paso esencial es la preparación de las muestras vegetales a analizar, desde su homogeneización completa, hasta la extracción eficiente de los ácidos nucleicos desde ella. Existen diferentes metodologías para la disrupción mecánica y homogeneización del tejido vegetal, que van desde macerar muestras individuales colocadas en una bolsa de plástico en presencia de tampón de lisis, hasta instrumentos automatizados de alto rendimiento para la disrupción de múltiples muestras mediante agitación a alta velocidad en tubos de plástico o de acero inoxidable, usando perlas de acero inoxidable, de circonio o de vidrio. Luego de la homogeneización, diversos métodos pueden seguirse para la extracción de ácidos nucleicos; este paso es crucial para un buen análisis, pues los tejidos de las vides (así como las plantas leñosas en general) tienen altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos que interfieren con el funcionamiento de las enzimas utilizadas en el proceso de RT-PCR (Gambino *et al.*, 2008), por lo tanto, la utilización de una metodología que elimine la mayor parte de los inhibidores es crucial para evitar falsos negativos.

La elección de un método de extracción de ácidos nucleicos depende del patógeno a analizar, la naturaleza de la muestra, el número de muestras analizadas por día y la facilidad de la técnica utilizada (Osman *et al.* 2012). Existen métodos de extracción de ARN basados en la utilización de fenol-cloroformo, utilizando la solubilidad de los ácidos nucleicos la fase acuosa, mientras que las proteínas y los lípidos son solubles en la fase orgánica (fenol-cloroformo); otras se basan en la extracción con sales caotrópicas (como el tiocianato de guanidinio) que desnaturalizan las proteínas, liberan los ácidos nucleicos y además tienen la capacidad de inhibir ARNasas (MacKenzie *et al.*, 1997), combinados con la utilización de partículas de sílica a cuya superficie se unen los ácidos nucleicos de forma reversible, posteriormente se pueden hacer lavados a la superficie de sílica para la eliminación de desechos celulares y de los tampones de extracción (Foissac *et al.*, 2001). Además, existe la alternativa de recurrir a kits comerciales optimizados para la extracción de ARN de plantas. En el paso final de los métodos de extracción utilizados se obtiene el ácido nucleico concentrado listo para continuar con la reacción de PCR. Existen distintos tipos de PCR que son utilizados para la detección de agentes infecciosos, los cuales son descritos a continuación:

a. RT-PCR: después de la extracción de los ácidos nucleicos se procede con la transcripción reversa (RT). En este paso se utiliza la enzima transcriptasa reversa (disponible comercialmente) para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN presente en la muestra, respetando el principio de complementariedad de bases nitrogenadas. Para iniciar este proceso, se requiere un partidor (o primer) que hibrida al ARN molde, sirviendo de punto de partida para la síntesis de una nueva cadena de ADN. Existen tres tipos principales de partidores: oligo(dT), aleatorios y específicos. Cada uno se une a una secuencia particular de ARN:

- Partidores oligo(dT): se unen a los ARN que contienen una cola de poli(A), por lo que sirven para la amplificación de virus que tienen una cola de poli(A) en el extremo 3', como es el caso de algunos virus como, por ejemplo GVA, GVB y GRSPaV (Zhang *et al.*, 1998).
- Partidores aleatorios (Random primers): son oligonucleótidos de secuencia aleatoria que pueden unirse a múltiples regiones del ARN. Esto los hace versátiles y permiten amplificar una amplia variedad de secuencias, incluyendo aquellas de virus como GLRaV-1 y GLRaV-3, que carecen de cola de poli(A) (Fazeli y Rezaian, 2000).
- Partidores específicos: se diseñan para unirse a secuencias únicas contenidas dentro del ARN de interés. Su uso entrega alta especificidad, pero limita la amplificación a esa región en particular, quitando versatilidad para reacciones de PCR subsecuentes. Son comúnmente empleados en reacciones de RT-PCR de un solo paso, donde se busca detectar una secuencia específica de manera muy precisa.

El ADNc obtenido a partir de la transcripción reversa servirá como molde para las siguientes reacciones de PCR (Figura 4.5).

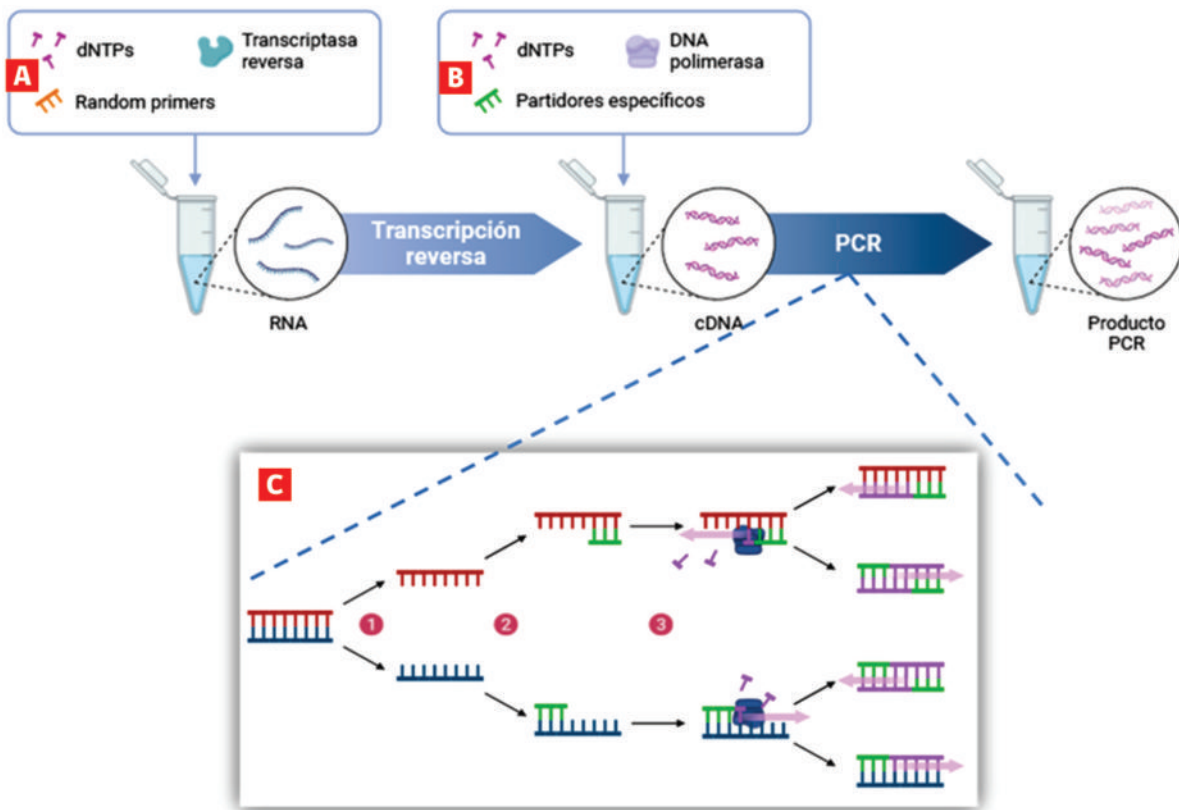


Figura 4.5. Esquema de RT-PCR. A. Transcripción reversa y sus principales reactivos. B. PCR y sus principales reactivos. C. Etapas de la PCR: 1: Denaturación, 2: Alineamiento, 3: Elongación.

La reacción de PCR utiliza varios reactivos:

- La enzima ADN polimerasa termoestable (disponible comercialmente) que es idónea para esta reacción debido a su resistencia a las altas temperaturas, las cuales son utilizadas durante el proceso.
- Iones de carga positiva, indispensables para el correcto funcionamiento de la enzima ADN polimerasa (normalmente corresponde a cloruro de magnesio) y cuya concentración debe ser optimizada para cada específico juego de partidores a utilizar.
- dNTPs (desoxirribonucleótidos-trifosfato) que son los monómeros que forman la hebra de ADN.
- Solución tampón que mantiene el pH de la reacción estable.
- Los partidores consisten en una secuencia, habitualmente de 18 a 24 nucleótidos, y que entrega la especificidad a la reacción. El partidor sentido corresponde a un fragmento de secuencia del ARN viral a detectar, mientras que el partidor antisentido corresponde a una secuencia complementaria de dicho ARN y se ubicará hacia el extremo 3' del amplicón. El buen diseño de los partidores determina la especificidad, sensibilidad y calidad de la detección viral (Arous *et al.*, 2018).

La amplificación del ADNc comienza con una denaturación, en donde todos los componentes de la reacción son calentados a 94 °– 95 °C, provocando que la doble hebra de ADN se separe en dos hebras simples que actuarán como molde para la producción de nuevas hebras de ADN. El siguiente paso es el alineamiento, donde los partidores se unen a una región específica de las hebras simples de ADN complementaria a su secuencia, evento que ocurre a una temperatura determinada por la composición nucleotídica de los partidores, y optimizada previamente. Es así que los partidores diseñados específicamente para unirse a un fragmento de genoma viral se alinearán a la secuencia sólo si existían partículas virales presentes en la extracción de la planta a analizar. Finalmente ocurre una etapa de extensión (generalmente a 72 °C) en que la ADN polimerasa agrega dNTPs desde la unión del partidor en dirección 5'–3' resultando en la formación de una doble hebra de ADN (Figura 4.5). Estas tres etapas se pueden repetir de 20 a 40 veces para producir millones de copias del fragmento de ADN de interés (Henson y French, 1993).

El PCR es una técnica muy versátil, por lo tanto, se pueden introducir modificaciones para realizar detecciones más específicas como identificar incluso cepas de un virus. También se pueden diseñar partidores para detectar ampliamente una infección viral a nivel de género (Digiario *et al.*, 2007).

En un PCR convencional el resultado se observa mediante la electroforesis, habitualmente en geles de agarosa, lo cual permite la visualización del producto de PCR en forma de una banda cuyo tamaño debe coincidir con el tamaño predicho en el diseño de los partidores. La electroforesis en geles de agarosa permite separar las moléculas de ADN de acuerdo a su tamaño y pueden ser visualizadas utilizando como tinción moléculas que se intercalan en el ADN y que emiten fluorescencia al exponerlas a luz UV.

Como se mencionó anteriormente, en Chile el SAG tiene una normativa para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación, y certificación de semillas, en la cual se especifica la técnica a utilizar para la detección de los virus solicitados, ya sea ELISA como RT-PCR. En el Cuadro 4.2 se detallan algunos partidores específicos para el análisis de virus que afectan a la vid mediante distintos tipos de PCR.

b. PCR múltiple: en esta técnica se pueden utilizar más de un par de partidores específicos para diferentes virus en una sola mezcla de reacción, donde cada amplicón se puede distinguir por su tamaño en un gel de agarosa (Gambino y Gribaudo, 2006). Esto tiene la ventaja de que permite la identificación simultánea de infecciones mixtas de una muestra en un solo PCR.

c. qPCR (quantitative real-time PCR): esta variante de PCR permite la cuantificación del fragmento viral presente en la muestra mediante el monitoreo en tiempo real de la producción de ADN durante la PCR utilizando fluorescencia. En general, dos metodologías pueden realizarse en un qPCR, una es utilizando sondas TaqMan, la cual consiste en un oligonucleótido de pequeño tamaño con una secuencia complementaria a la de interés viral. Esta sonda se encuentra unida en su extremo 5' a un fluorocromo, utilizado como reportero y en su extremo 3' a un apantallador que inhibe la fluorescencia del reportero (Figura 4.6). Durante la reacción de extensión, si la sonda se encuentra unida a la secuencia complementaria, se produce el corte de la sonda por parte de la Taq polimerasa, separando el reportero del apantallador lo que resulta en un aumento de la fluorescencia del reportero (Figura 4.6), así la acumulación del producto de PCR es detectada monitoreando el aumento en la fluorescencia del reportero (Osman *et al.*, 2007). La segunda metodología para realizar qPCR es utilizando moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN doble hebra independiente de la secuencia, así al aumentar la producción de amplicones (doble hebra) la fluorescencia aumenta, lo que puede ser monitoreado en tiempo real (Poojari *et al.*, 2016).

En el qPCR se obtiene un dato importante denominado umbral del ciclo (cycle threshold, CT), que corresponde al número de ciclos en que es posible detectar el ARN viral en una muestra, el cual varía dependiendo de la carga viral de cada muestra. Si este valor se compara con una curva estándar con concentraciones conocidas de ARN viral, es posible determinar la concentración relativa del virus en la muestra analizada.

Cuadro 4.2. Partidores específicos para distintos virus y técnicas.

Virus	Nombre	Secuencia 5' -> 3'	Tamaño	Referencia
RT-PCR:				
GFLV	H2999	TCGGGTGAGACTGCGCAACTTCCTA	312 pb	MacKenzie <i>et al.</i> , (1997)
	C3310	GATGGTAACGCTCCCGCTGCTCTT		
	V1 C1	ACCGGATTGACGTGGGTGAT CCAAAGTTGGTTCCCAAGA	321 pb	Rowhani, (1993)
ArMV	ArMV-5A ArMV-3A	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAACTCATAACCCAC	302 pb	Faggioli <i>et al.</i> , (2005)
ToRSV	U1 D1	GACGAAGTTATCAATGGCAGC TCCGTCCAATCACGGAATA	449 pb	Griesbach, (1995)
GLRaV-1	GSP3	CGTTCGCGTTACCCACGCTGCCTA	150 pb	Good y Monis, (2001)
	GSP4	GCTGGCAAACCTGGTGGACTTTACATC		
	pORF9F pORF9R	GGCTCGAGATGGCGTCACTTATACCTA CCTCTAGACACCAAATTGCTAGCGA	633 pb	Little y Rezaian, (2006)
GLRaV-2	V2dCPf2 V2CPr1	ACGGTGTGCTATAGTGCCTG GCAGCTAAGTACGAATCTTC	515 pb	Bertazzon y Angelini, (2004)
GLRaV-3	P3U P3D	CGCTCATGGTGAAAGCAGACG CTTAGAACAAAAATATGGAGCAG	653 pb	Turturo <i>et al.</i> , (2005)
GLRaV-4	HSPV F HSPC R	ACATTCTCCACCTTGTGCTTTT CATACAAGCGAGTGCAATTACA	319 pb	Osman <i>et al.</i> , (2007)
GLRaV-7	LR7 G23metF LR7 G23metR	AATGACTGTGATGTCGCTTTTAC TACCACTACCAGGAGTTTATTCA	190 pb	Turturo <i>et al.</i> , (2000)
GVA	H587 C995	GACAAATGGCACACTACG AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG	430 pb	Minafra y Hadidi, (1994)
GVB	H28	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	460 pb	Minafra y Hadidi, (1994)
	C410	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG		
	GVB-F GVB-R	GTGTACGAGACAATAAGCAAGCA GTAGCCCTTCGTTAGCCGCACT	722 pb	Hu <i>et al.</i> , (2014)
GRSPaV	48V 49C	AGCTGGGATTATAAGGGAGGT CCAGCCGTTCACCACTAAT	331 pb	Lima <i>et al.</i> , (2006)
GFkV	GFkV-F GFkV-R	TTCACAACACAATCCAGAAGGATAC CTCTCATGAACATGACCGTGG	262 pb	Matus <i>et al.</i> , (2008)
GPGV	DetF DetR	TGGTCTGCAGCCAGGGGACA TCACGACCGGCAGGGAAGGA	588 pb	Morelli <i>et al.</i> , (2014)
GSyV-1	SY5922F SY6295R	CCAATGGGTCGCACTTGTG ACTTCATGGTGGTGCCGGTG	374 pb	Glasa <i>et al.</i> , (2015)
TRSV TRSV	MF05-22-F MF05-21-R	CAGGGGCGTGAGTGGGGGCTC CAATACGGTAAGTGCACACCCCG	320 pb	Fuchs <i>et al.</i> , (2010)
SLRV SLRV	SLRSV-5D SLRSV-3D	CCCTTGTTACTTTTACCTCCTATTGTCC AGGCTCAAGAAAACACAC	293 pb	Faggioli <i>et al.</i> , (2002)

Continuación Cuadro 4.2.

Virus	Nombre	Secuencia 5' → 3'	Tamaño	Referencia
PCR Múltiple:				
GFLV	FL-F FL-R	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	118 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
GLRaV-1	LR1-F LR1-R	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	232 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
GLRaV-2	LR2-F LR2-R	GGTGATAACCGACGCCTCTA CCTAGCTGACGCAGATTGCT	543 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
ArMV	ArMV-F ArMV-R	ATGCTGATGTTGGAGTTGCTCT AGTGGCACTAAACCACAAAGC	416 pb	Gambino, (2015)
GLRaV-3	LR3-F LR3-R	TACGTTAAGGACGGGACACAGG TGCGGCATTAATCTTCATTG	336 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
GVA	GVA6591F GVA6862R	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA TCGAACATAACCTGTGGCTC	272 pb	Goszczynski y Jooste, (2003)
GfKV	GfKV-F GfKV-R	TGACCAGCTGCTGTCTCTA TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	179 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
GRSPaV	GRSPaV-F GRSPaV-R	GGGTGGGATGTAGTAACCTTTGA GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT	155 pb	Gambino y Gribaudo, (2006)
qPCR:				
GLRaV-4	HSP-85 F HSP-178 R HSP-120 P	ATATACATACCAACCGTTGTGGGTATAA CCCTATAAACTAGCACATCCTTCTCTAGT TGGAACATATACCATTGGGCTTGGTGCT	93 pb	Osman <i>et al.</i> , (2007)
GLRaV-1	HSP70-149 F HSP70-293 R HSP70-225 P	ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT GTAAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT ACGAGATATCTGTGGACGGA	168 pb	Osman <i>et al.</i> , (2007)
GLRaV-2	198 F 290 R 233 P	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT GATGACAACCTCTGTCCGCTATAGC TTGCTACTGATCGACTGTGCAGCTCACA	116 pb	Osman <i>et al.</i> , (2007)
GLRaV-3	56 F 285 R 181 P	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA GTATTGGACTACCTTTCCGGGAAAAT CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA	254 pb	Osman y Rowhani, (2006)
GFLV	GFLV-769f GFLV-868r GFLV-799p	GGGACCACTATGGATGGAATGA TTCGGTGATATGGAGAGCGAAT AAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGA	99 pb	Osman y Rowhani, (2006)
ToRSV	ToRSV-1590 f ToRSV-1661 r ToRSV-1610 p	GCCACCCGAGAACGTTAGC GCCTGCTGAGTCTGCTGTAGAG CCACGGGCCCGGTAGTCAATATG	71 pb	Osman <i>et al.</i> , (2008)

d. PCR anidado o nested-PCR: consiste en dos reacciones de PCR consecutivas, siendo ocupado el producto de la primera ronda de reacción de PCR como templado para una segunda reacción de PCR, de este modo se aumenta la sensibilidad; esto dado porque la segunda ronda de PCR parte de una cantidad mayor de ADN molde (producto de la primera ronda), lo que aumenta la probabilidad de amplificar incluso cantidades muy pequeñas de la secuencia objetivo, siendo particularmente útil para analizar muestras con baja carga viral. Como desventaja, la PCR anidada tiene un mayor riesgo de contaminación, además de un aumento en el costo y tiempo de análisis.

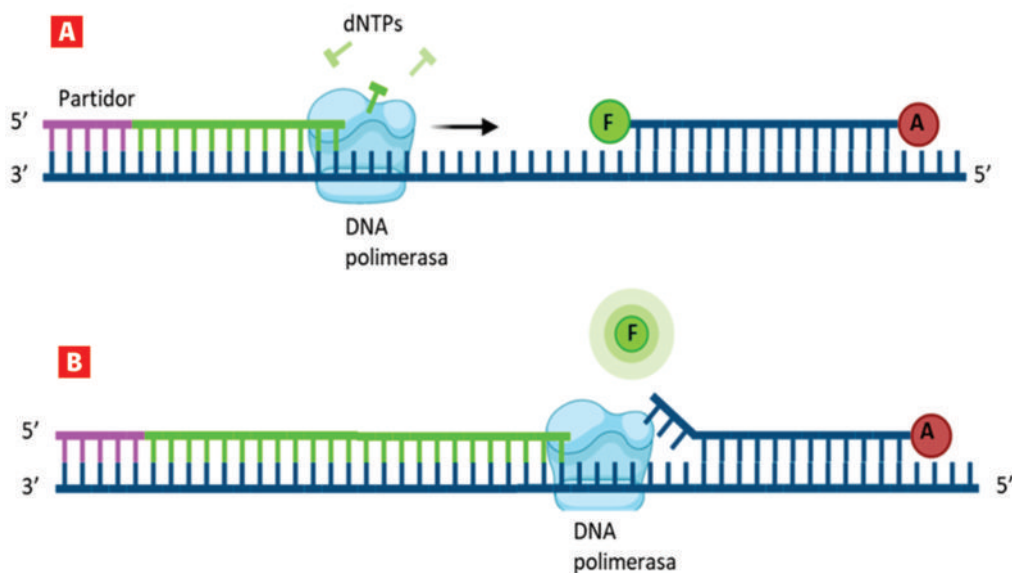


Figura 4.6. Esquema de qPCR con sonda. A. Amplificación. La sonda se encuentra unida al templado. B. Hidrolización de la región reportera por acción de la ADN polimerasa. En celeste: ADN polimerasa. Rosado: unión del partidor. Círculo rojo: Apantallador de la sonda. Círculo verde: fluorocromo de la sonda.

En el caso de vides, esta metodología es ocupada principalmente para la determinación de ciertos organismos no virales, como fitoplasmas. Para la detección de estos organismos los partidores recomendados son P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y R16F2n/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996; Lee *et al.*, 1993). Sin embargo, se puede encontrar falsos positivos con bacterias emparentadas estrechamente (Fránová, 2011), así que si el resultado es positivo se debería secuenciar el producto de la PCR.

En todos los tipos de PCR que se realizan, ya sea convencional, anidado o qPCR, es importante utilizar un control interno de la extracción, ya que las muestras podrían contener compuestos inhibidores de la PCR o la extracción de ácidos nucleicos podría haber sido deficiente. Para comprobar la integridad de los extractos de ADN o ARN, se realiza un PCR utilizando partidores de control interno que amplifican un gen o transcrito, según sea el caso, de la planta hospedante.

4.3.2. LAMP

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) es una técnica relativamente nueva que también se basa en la amplificación de ácidos nucleicos. A diferencia de la PCR, que requiere múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento, la LAMP se lleva a cabo a una temperatura constante fija entre 60–65 °C lo que simplifica significativamente el proceso, además de tener una alta especificidad, es rápida y más resistente a los inhibidores que se encuentren en la muestra (Almasi, 2015; Walsh y Pietersen, 2013).

En esta técnica se utiliza una polimerasa de ADN que también posee la capacidad de desplazar las cadenas de ADN. Además, se utilizan al menos cuatro partidores: dos internos en que cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN de interés; y dos partidores externos que se unen a regiones específicas de la secuencia molde, pero en los extremos de la región a amplificar (Figura 4.7); alternativamente se pueden agregar dos partidores de horquilla, que otorgan mayor velocidad a la reacción (Akhmetzianova *et al.*, 2024). En LAMP se genera una reacción en cadena que produce amplicones en forma de estructuras de horquilla, cuyo resultado se puede observar por aumento de turbidez o cambios de color.

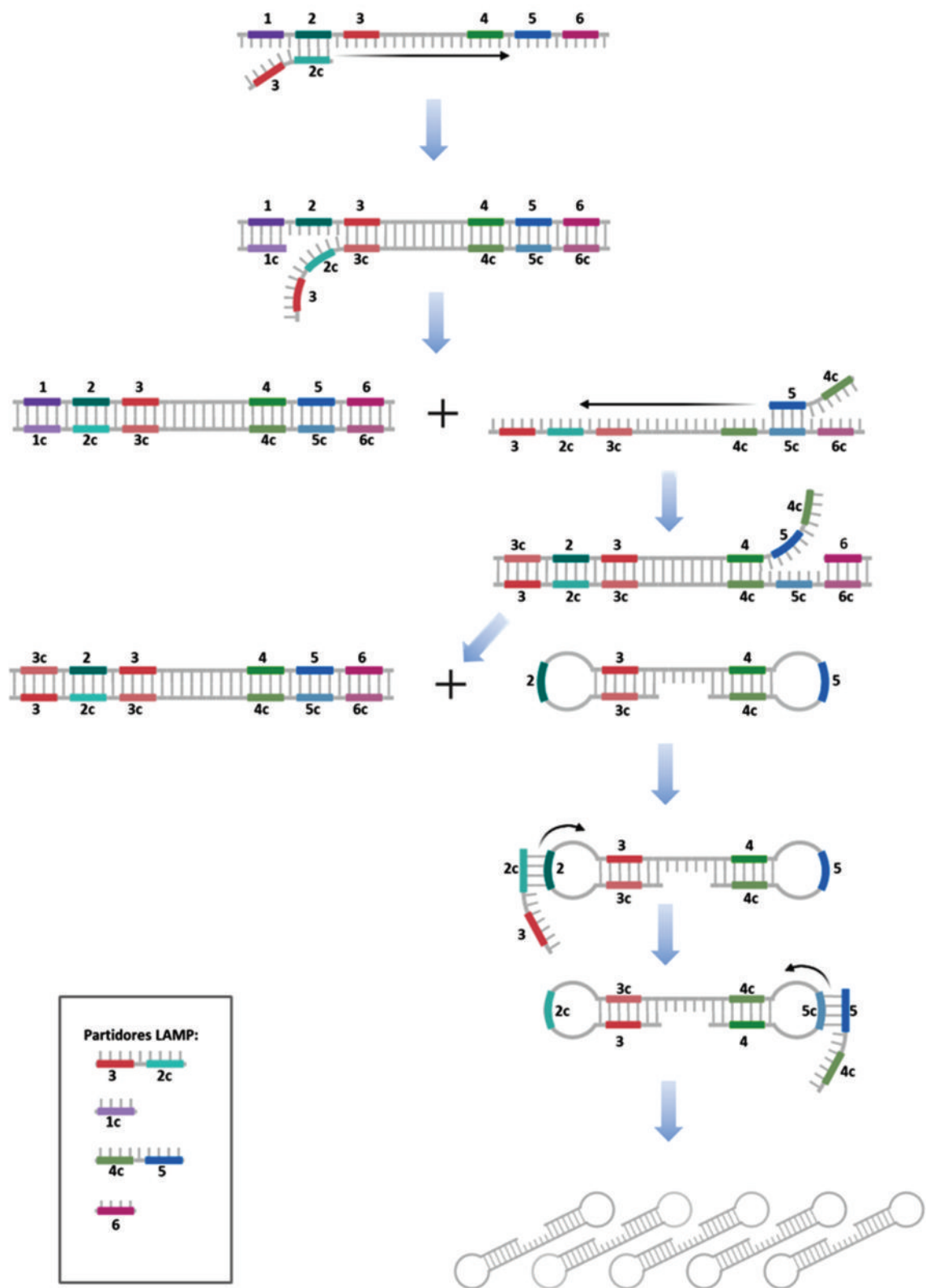


Figura 4.7. Esquema la técnica LAMP. En cuadro gris se muestran los partidores. Los segmentos de colores ejemplifican segmentos del ADN templado y sus segmentos complementarios (c). Las flechas negras indican el sentido de la amplificación. Las flechas celestes indican las sucesivas uniones de partidores y amplificaciones con las formaciones de los loop.

Una de las desventajas de esta técnica es que el diseño de partidores específicos y eficientes puede ser más complejo que para la PCR y, en algunas ocasiones, se pueden obtener falsos positivos debido a la formación de estructuras secundarias en el ADN.

4.3.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

Las técnicas basadas en serología o en PCR sólo pueden ser utilizadas si existe información genómica previa del patógeno o anticuerpos disponibles, por lo que nuevos virus no pueden ser identificados por estos métodos. Sin embargo, NGS (Next Generation Sequencing) permite secuenciar grandes cantidades de ADN de una muestra de forma rápida, generando una gran cantidad de datos genómicos disponibles. De este modo, no solo sirve para identificar un virus presente, sino que todos los virus que puedan estar presentes en una muestra (viroma), así como la identificación de nuevos virus y también para estudiar la diversidad genética de éstos (Saldarelli *et al.*, 2015).

Para la detección de virus con NGS se han usado diferentes estrategias, como la secuenciación de ARN total combinado con metagenómica (Adams *et al.*, 2009); aunque mejores resultados se han encontrado utilizando la secuenciación de pequeños ARNs (Kreuze *et al.*, 2009) que pueden ser producidos como producto del silenciamiento génico en respuesta a una infección viral o como parte del ciclo de replicación de un virus. Otra estrategia muy utilizada ha sido secuenciar ARNs de doble hebra (Coetzee *et al.*, 2010) con la cual se logró identificar el virus *Vitivirus phivitis* (Grapevine virus F, GVF) (Rwahnih *et al.*, 2012). El virus *Trichovirus pinovitis* (Grapevine Pinot gris virus, GPGV) fue descubierto mediante la secuenciación de pequeños ARN (Giampetruzzi *et al.*, 2012), al igual que el virus *Badnavirus decolorativitis* (Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus, GRLDaV) (Maliogka *et al.*, 2015). Por análisis de secuenciación de ARN doble hebra combinado con metagenómica fue descubierto el virus Grapevine red blotch virus (GRBV) (Rwahnih *et al.*, 2013).

Si bien, NGS es muy útil para la identificación de nuevos virus, estudios de infecciones mixtas y de diversidad genética, por sí solo no entrega información de la patogenicidad del virus y, dado que en general las plantas se encuentran infectadas por más de un virus, al descubrir un nuevo virus, se deben realizar más estudios para asociarlo a síntomas observados, como por ejemplo el indexado biológico descrito al inicio. La complejidad y alto costo de NGS no lo hace aconsejable para diagnósticos de rutina, sin embargo, entrega mucha información para, por ejemplo, diseñar partidores que sirvan para un diagnóstico rutinario por PCR. Dado que la tecnología evoluciona rápidamente, es posible que NGS se transforme en una metodología más accesible y rutinaria en el futuro.

4.4. Toma de muestras

Para todos los tipos de análisis de patógenos, ya sean serológicos o moleculares, uno de los aspectos más importantes a considerar al momento de decidir hacer un análisis, es el tejido y la temporada en que se va a realizar el testeo. Los virus pueden tener un bajo título o distribución desigual dentro de la planta, por lo cual se recomienda testear en determinadas temporadas del año y en determinados tejidos, dependiendo del virus que se desea detectar (Cuadro 4.3) (Blouin *et al.*, 2017).

Antes de enviar muestras a un laboratorio para su análisis, se debe individualizar e identificar correctamente cada una, ya sean ramillas u hojas. Cada muestra debe ser envuelta en papel húmedo, colocada en una bolsa individual, rotulada y mantenida a una temperatura de alrededor de 4 °C. Para mantener la temperatura se puede utilizar baterías frías hasta su arribo al laboratorio, lo cual no debiese ocurrir en más de 72 horas desde la toma de muestra (Figura 4.8). Una vez en el laboratorio las muestras se almacenan a 4 °C hasta su procesamiento.

Cuadro 4.3. Guía para muestreo de vides. Tejidos a utilizar para el análisis de cada virus y la mejor temporada para su detección.

Enfermedad	Tejido	Temporada
Degeneración infecciosa	Hojas de zona de activo crecimiento	Primavera
	Floema	Otoño-Invierno
Enrollamiento de la hoja de la vid	Hojas desde la base hasta la mitad de altura	Final verano-otoño
	Floema	Otoño-Invierno
Fleck	Hojas de zona de activo crecimiento	Primavera
	Floema	Otoño-Invierno
Complejo rugoso de la madera (sólo vitivirus)	Floema	Otoño-Invierno



Figura 4.8. Pasos para la preparación de muestras para análisis en laboratorio. A: Muestreo de hojas de vid. B: Empaquetado en papel. C: Almacenamiento en bolsa y humedecimiento del papel. D: Identificación de la muestra.

4.5. Bibliografía

Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., y Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537–545. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>

Akhmetzianova, L. U., Davletkulov, T. M., Sakhabutdinova, A. R., Chemeris, A. V., Gubaydullin, I. M., y Garafutdinov, R. R. (2024). LAMPrimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Analytical Biochemistry*, 684, 115376. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115376>

- Almasi, M. (2015). Establishment and Application of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Grapevine Fanleaf Virus. *Molecular Biology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000149>
- Arous, S., Harmon, C. L., Capobianco, H. M., y Polston, J. E. (2018). Comparison of genus-specific primers in RT-PCR for the broad-spectrum detection of viruses in the genus Potyvirus by plant diagnostic laboratories. *Journal of Virological Methods*, 258, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.05.003>
- Bendix, C., y Lewis, J. D. (2017). The enemy within: Phloem-limited pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 238–254. <https://doi.org/10.1111/mpp.12526>
- Bertazzon, N., y Angelini, E. (2004). Advances in the Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus 2 Variants. *Journal of Plant Pathology*, 86(4), 283–290
- Blouin, A. G., Chooi, K. M., Cohen, D., y MacDiarmid, R. M. (2017). Serological Methods for the Detection of Major Grapevine Viruses. En: B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino, y M. Fuchs (eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 409–429). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_21
- Coetzee, B., Freeborough, M.-J., Maree, H. J., Celton, J.-M., Rees, D. J. G., y Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.023>
- Deng, S., y Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
- Digiario, M., Elbeaino, T., y Martelli, G. P. (2007). Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.033>
- Faggioli, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V., y Barba, M. (2005). Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87(1), 49–55
- Faggioli, F., Ferretti, L., Pasquini, G., y Barba, M. (2002). Detection of strawberry latent ring spot virus in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 150(11–12), 636–639. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00810.x>
- Fazeli C. F., y Rezaian M. A. (2000) Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. *Journal Of General Virology*, 81(3), 605–615. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-605>
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M. J., Candresse, T., y Gentit, P. (2001). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550, 37–44. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.550.2>
- Fránová, J. (2011). Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64, S287–S288

- Fuchs, M., Abawi, G. S., Marsella-Herrick, P., Cox, R., Cox, K. D., Carroll, J. E., y Martin, R. R. (2010). Occurrence of tomato ringspot virus and tobacco ringspot virus in highbush blueberry in New York State. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 451-459
- Gambino, G. (2015). Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses. En: Uyeda, I., Masuta, C. (eds). *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology*, 1236 (pp. 39-47). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_4
- Gambino, G., y Gribaudo, I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant rna as internal control. *Phytopathology*, 96(11), 1223-1229. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-1223>
- Gambino, G., Perrone, I., y Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., y Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1), 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2011.10.010>
- Glasa, M., Predajňa, L., Šoltys, K., Sabanadzovic, S., y Olmos, A. (2015). Detection and molecular characterisation of Grapevine Syrah virus-1 isolates from Central Europe. *Virus Genes*, 51(1), 112-121. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1201-1>
- Good, X., y Monis, J. (2001). Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of grapevine leafroll-associated virus-5. *Phytopathology*, 91(3), 274-281. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.3.274>
- Goszczynski, D. E., y Jooste, A. E. C. (2003). Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4), 397-403. <https://doi.org/10.1023/A:1023555018700>
- Griesbach, J. A. (1995). Detection of Tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 79(10), 1054. <https://doi.org/10.1094/PD-79-1054>
- Gundersen, D. E., y Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144-151
- Hao, X. Y., Bi, W. L., Cui, Z. H., Pan, C., Xu, Y., y Wang, Q. C. (2017). Development, histological observations and Grapevine leafroll-associated virus-3 localisation in *in vitro* grapevine micrografts. *Annals of Applied Biology*, 170(3), 379-390. <https://doi.org/10.1111/aab.12342>
- Hao, X. Y., Jiao, B. L., Wang, M. R., Wang, Y. L., Shang, B.-X., Wang, J.-Y., Wang, Q.-C., y Xu, Y. (2021). *In vitro* biological indexing of grapevine leafroll-associated virus 3 in red- and white-berried grapevines (*Vitis vinifera*). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27(4), 483-490. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12505>
- Henson, J. M., y French, R. (1993). The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 81-109. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000501>

- Hu, G. J., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Fan, X. D., Fang, R., y Zhu, H. J. (2014). Detection and sequence analysis of grapevine virus B isolates from China. *Acta Virologica*, 58(2), 180-184. https://doi.org/10.4149/av_2014_02_180
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., y Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024>
- Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E., y Gundersen, D. E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology*, 83(8), 834-842. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-834>
- Legrand, P. (2015). Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: A review. *EPPO Bulletin*, 45(2), 240-251. <https://doi.org/10.1111/epp.12222>
- Lima, M. F., Alkowni, R., Uyemoto, J. K., Golino, D., Osman, F., y Rowhani, A. (2006). Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology*, 151(9), 1889-1894. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0742-y>
- Little, A., y Rezaian, M. A. (2006). Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Archives of Virology*, 151(4), 753-761. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0649-z>
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., y Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81(2), 222-226. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.222>
- Maliogka, V. I., Olmos, A., Pappi, P. G., Lotos, L., Efthimiou, K., Grammatikaki, G., Candresse, T., Katis, N. I., y Avgelis, A. D. (2015). A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research*, 203, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.003>
- Matus, J. T., Vega, A., Loyola, R., Serrano, C., Cabrera, S., y Arce-Johnson, P. (2008). Phytoplasma and virus detection in commercial plantings of *Vitis vinifera* cv. Merlot exhibiting premature berry dehydration. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(5), 7-8. <https://doi.org/10.4067/S0717-34582008000500007>
- Minafra, A., y Hadidi, A. (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47(1), 175-187. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90076-0)
- Morelli, M., De Moraes Catarino, A., Susca, L., Saldarelli, P., Gualandri, V., y Martelli, G. P. (2014). First report of grapevine Pinot Gris virus from table grapes in southern Italy. *Journal Of Plant Pathology*, 96(2), 439. <https://doi.org/10.4454/jpp.v96i2.039>
- Osman, F., y 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(2), 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.11.005>

- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D., y Rowhani, A. (2007). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D., y Rowhani, A. (2008). Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 149(2), 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.012>
- Osman, F., Olineka, T., Hodzic, E., Golino, D., y Rowhani, A. (2012). Comparative procedures for sample processing and quantitative PCR detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 179(2), 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.008>
- Pathirana, R., y McKenzie, M.J. (2005). Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell Tissue And Organ Culture (PCTOC)*, 81(1), 11-18 <https://doi.org/10.1007/s11240-004-2498-y>
- Poojari, S., Alabi, O. J., Okubara, P. A., y Naidu, R. A. (2016). SYBR® Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 235, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.013>
- Rowhani, A. (1993). Development of a Polymerase Chain Reaction Technique for the Detection of Grapevine Fanleaf Virus in Grapevine Tissue. *Phytopathology*, 83(9), 749. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-749>
- Rowhani, A., La Notte, P., Uyemoto, J. K., Daubert, S. D., y Savino, V. (2017). Biological Assays. En: B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino, & M. Fuchs (eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 395-407). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_20
- Roy, B. G., y Fuchs, M. (2022). Herbaceous plant hosts as supermodels for grapevine viruses: A historical perspective. *Journal of Plant Pathology*, 106(2), 327-356. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01267-z>
- Rwahnih, M., Sudarshana, M. R., Uyemoto, J. K., y Rowhani, A. (2012). Complete Genome Sequence of a Novel Vitivirus Isolated from Grapevine. *Journal of Virology*, 86(17), 9545-9545. <https://doi.org/10.1128/jvi.01444-12>
- Rwahnih, M. A., Dave, A., Anderson, M. M., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., y Sudarshana, M. R. (2013). Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*, 103(10), 1069-1076. <https://doi.org/10.1094/phyto-10-12-0253-r>
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., y Gualandri, V. (2015). Genetic variability of grapevine Pinot gris virus and its association with Grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology*, 105(4), 555-563. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0241-R>
- Schneider, B., Seemueller, E., Smart, C. D., y Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. En: S. Razin & J. G. Tully (eds.), *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (pp. 369-380). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50040-6>

- Servicio Agrícola Ganadero. (2023). Instructivo técnico para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación. <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/D-ATR-AAT-037-IT-diagnostico-virus-V02-FINAL.pdf>
- Tanne, E., Shlamovitz, N., y Spiegel-Roy, P. (1993). Rapidly diagnosing grapevine Corky-bark by *in vitro* micrografting. *HortScience HortSci*, 28(6), 667-668. <https://doi.org/10.21273/hortsci.28.6.667>
- Turturo C., Rott ME., Minafra A., Saldarelli P., Jelkmann W., y Martelli GP. (2000) Partial molecular characterization and RT-PCR detection of grapevine leafroll associated virus 7. En: *Proceedings of the 13 Meetings of the International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine* (pp. 17-18). Adelaide, Australia
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., y Martelli, G. P. (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal Of General Virology*, 86(1), 217-224. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80395-0>
- Walsh, H. A., y Pietersen, G. (2013). Rapid detection of Grapevine leafroll-associated virus type 3 using a reverse transcription loop-mediated amplification method. *Journal of Virological Methods*, 194(1), 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.030>
- Zhang YP., Uyemoto JK., Golino DA., y Rowhani A. (1998). Nucleotide sequence and rt-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology*, 88(11), 1231-7. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1231>



(factor: 40)

#1

A260 (10 mm): 26.099

A260/A280: 1.92

1043.9 ng/μl

02 Dec 2024 18:59:33
Blank1 02 Dec 2024 18:59:12

Measure sample		Measure
Home	Blank	

Virus transmitidos por coccoídeos (Insecta: Hemiptera)

Capítulo

5



Capítulo 5

Virus transmitidos por coccoídeos (Insecta: Hemiptera)

Nancy Vitta P.

Ingeniera Agrónoma, Magíster

Claudio Salas F.

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Los insectos del orden Hemiptera, específicamente de la superfamilia Coccoidea (comúnmente conocidos como chanchitos blancos), comprenden aproximadamente 7.700 especies distribuidas en más de 1.050 géneros (González, 2016). Estas especies fitófagas son relevantes para la agricultura debido a su capacidad de alimentarse del floema de las plantas mediante estiletes bucales, lo que les permite extraer savia. Además de causar daños directos al debilitar las plantas, algunos chanchitos blancos actúan como vectores de virus que afectan gravemente la productividad y calidad de cultivos de alto valor comercial, como las vides, generando pérdidas económicas significativas.

La superfamilia Coccoidea incluye familias como Diaspididae (escamas), Pseudococcidae (chanchitos blancos) y Coccidae (conchuelas). Solo estas últimas familias son identificadas como insectos vectores de virus de los géneros Ampelovirus (familia Closteroviridae) y Badnavirus (familia Caulimoviridae) de manera semipersistente.

Hasta la década de 1980, la diseminación de los ampelovirus y vitivirus se asociaba a la transmisión por injerto y al movimiento de material de propagación infectado (Cabaleiro y Segura, 1997; Golino *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2010). No obstante, a partir de 1983 una serie de experimentos demostraron que la transmisión de estos virus está asociada a representantes de la familia Pseudococcidae y Coccidae (Cabaleiro y Segura, 1997; Tsai *et al.*, 2010).

Los coccoídeos transmiten virus a través de sus estiletes bucales, perforando tejidos vasculares de las plantas y permitiendo la propagación de patógenos. Esto las convierte en un desafío fitosanitario en cultivos como los viñedos, donde es crucial su manejo integrado para prevenir enfermedades virales que comprometen la sanidad y el rendimiento de las plantas. Los virus pueden persistir en el sistema digestivo de los coccoídeos, permitiendo su transmisión a nuevas plantas, y en algunos casos, la afinidad de ciertos virus por los tejidos afectados hace que algunas especies de chanchitos blancos sean vectores especialmente efectivos.

5.1. Coccoídeos como vectores y mecanismos de transmisión de virus

Los chanchitos blancos son insectos fitófagos que, además de causar daño directo a las plantas al alimentarse de su savia, juegan un papel significativo en la transmisión de virus que afecta a las vides. Estas especies se distribuyen en diversas regiones de Chile, donde su presencia puede influir en la productividad de los cultivos vitícolas.

Los virus se clasifican en función del tiempo que el vector permanece virulífero (es decir, capaz de transmitir la infección) y del recorrido del virus dentro del insecto. Así, según el tipo de transmisión, los virus pueden ser: persistentes, semipersistentes o no persistentes. Los virus no persistentes tienen un breve periodo de retención en el estilete del vector y se transmiten en las primeras picaduras de prueba que el insecto realiza después de adquirir el virus.

En el caso de los virus semipersistentes, estos se mantienen por más tiempo en el estilete o en el intestino anterior del vector, aunque tampoco necesitan una fase de latencia entre su adquisición y transmisión. Por su parte, los virus persistentes requieren de períodos más largos de adquisición y transmisión, los que pueden extenderse por varios días. En estos casos, existe una fase de latencia en la que el vector porta el virus, pero aún no tiene la capacidad de transmitirlo.

La transmisión de virus por parte de chanchitos blancos y conchuelas blandas es generalmente, si no siempre, semipersistente (Charles *et al.*, 2006).

Respecto a la ruta de transmisión dentro del insecto, los virus no circulativos solo requieren adherirse a las cutículas del estilete o al intestino anterior para ser transmitidos. En cambio, los virus circulativos ingresan al sistema circulatorio del vector, acumulándose en las glándulas salivares y transmitiéndose a las plantas durante la alimentación del insecto.

Para alimentarse, los coccoídeos insertan sus piezas bucales delgadas para succionar y perforar profundamente en la epidermis del tallo, hojas y fruta de sus huéspedes, inyectando al mismo tiempo el virus en estos tejidos. El movimiento y alimentación permiten transmitir el virus entre diferentes plantas hospedantes (Mathulwe *et al.*, 2021).

En comparación con mosquitas blancas y pulgones, tanto chanchitos blancos como conchuelas son considerados menos eficaces en la transmisión de virus de plantas por su naturaleza menos móvil. Además, el sexo y la edad de los chanchitos blancos afectan las tasas de transmisión, por ejemplo, hembras adultas jóvenes de chanchitos blancos son más eficientes en la transmisión de virus (Ahmed, *et al.*, 2023; Hommay *et al.*, 2022). En tanto, la eficiencia de transferencia de GLRaV-3 y GLRaV-5 por *Planococcus ficus* en sus estados juvenil y adulto fue del 23,3 % para GLRaV-3 y del 8,3 % para GLRaV-5, respectivamente (Mahfoudhi *et al.*, 2009).

A continuación, en el Cuadro 5.1, se detallan algunas de las especies de coccoídeos presentes en el país, junto con su distribución y los virus que transmiten, lo que destaca la importancia de estos insectos en la epidemiología de las enfermedades.

Cuadro 5.1. Especies de coccoídeos y virus transmitidos en *Vid vinifera*.

Familia	Especie	Distribución	Virus que transmite	Tipo de transmisión	Referencias
Pseudoccidae	<i>Pseudococcus viburni</i>	Arica y Parinacota hasta el Biobío	GLRaV-3	Semipersistente	Salazar <i>et al.</i> , (2010), Mathulwe <i>et al.</i> (2021)
Pseudoccidae	<i>Pseudococcus longispinus</i>	Arica y Parinacota hasta el Biobío	GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4, GVA	Semipersistente	Sandanayaka <i>et al.</i> , (2010, 2013), Douglas y Krüger (2008)
Pseudoccidae	<i>Planococcus citri</i>	Arica y Parinacota hasta el Biobío	GLRaV-3, GVB	Semipersistente	Cabaleiro y Segura (1997b), Salazar <i>et al.</i> , (2010)
Pseudoccidae	<i>Pseudococcus calceolariae</i>	Arica y Parinacota hasta La Araucanía	GLRaV-3	Semipersistente	Petersen y Charles (1997), McGreal <i>et al.</i> , (2021)

Continuación del Cuadro 5.1.

Familia	Especie	Distribución	Virus que transmite	Tipo de transmisión	Referencias
Pseudococcidae	<i>Planococcus ficus</i>	Atacama	GLRaVs	Semipersistente	Becerra <i>et al.</i> , (2006), González (2011), Guarío <i>et al.</i> , (2014)
Coccidae	<i>Partenolecanium corni</i>	Atacama hasta el Biobío	GLRaV, GVA	Semipersistente	Hommay <i>et al.</i> , (2022)

5.2. Ciclo biológico de coccóideos, hábitos alimenticios y comportamiento

El ciclo biológico de los coccóideos consta de varias etapas que varían según la especie, las condiciones ambientales y los hospedantes. Siguen una metamorfosis gradual que incluye las fases de huevo, ninfa (con varias etapas de desarrollo denominadas instares) y adulto. Su reproducción es diversa: muchas especies se reproducen por partenogénesis, es decir, sin requerir fecundación masculina, mientras que otras presentan reproducción sexual. Esta diversidad reproductiva les confiere una alta capacidad de adaptación y expansión en distintos ecosistemas (Gullan & Kosztarab, 1997).

En las especies con reproducción sexual, se observa un marcado dimorfismo entre hembras y machos, siendo estos últimos alados en su etapa adulta.

En el caso de los Pseudococcidae, las hembras suelen depositar los huevos en masas protegidas por secreciones cerosas, que también cubren sus cuerpos, proporcionando una capa protectora que les ayuda a resistir los tratamientos de control. Las ninfas emergen y pasan por tres a cuatro instares antes de alcanzar la fase adulta, tiempo en el cual se desplazan activamente para buscar sitios de alimentación adecuados en las plantas. En los Coccidae, o conchuelas, las hembras producen menos secreciones cerosas y a menudo son móviles solo en las etapas juveniles; una vez adultas, se fijan en la planta y desarrollan una capa cerosa que les confiere protección adicional. Este ciclo de fijación limita el movimiento de los adultos, aunque las ninfas de primeros estadios suelen diseminarse ampliamente antes de asentarse en sitios de alimentación (Miller & Davidson, 2005).

La duración completa del ciclo biológico de los coccóideos depende de las condiciones climáticas y del tipo de hospedador. En ambientes cálidos y protegidos, los ciclos pueden ser más cortos y permiten múltiples generaciones al año, mientras que, en climas fríos, el ciclo se alarga, reduciendo la cantidad de generaciones anuales. Esto convierte a los chanchitos blancos en plagas persistentes y difíciles de manejar en sistemas agrícolas, ya que su capacidad de reproducción rápida y adaptación a ambientes controlados les facilita colonizar nuevas áreas y aumentar sus poblaciones rápidamente.

Los chanchitos blancos se alimentan del floema de las plantas, utilizando piezas bucales adaptadas para perforar y succionar los fluidos vasculares desde distintas partes de la vid, incluyendo troncos, brotes, hojas y bayas. No obstante, el comportamiento de alimentación de estos insectos varía estacionalmente y difiere entre especies, e incluso dentro de la misma especie, en cuanto a la ubicación específica en la planta (Almeida *et al.*, 2013). Esta dinámica de alimentación estacional influye en su rol como vectores de enfermedades, ya que, al desplazarse entre diversas partes de la vid, incrementan la probabilidad de dispersión de virus.

Algunas especies de chanchitos blancos, como *Pseudococcus calceolariae* y *Planococcus ficus*, tienen la capacidad de mantener una parte significativa de su población en las raíces de la vid. Este comportamiento radicular representa un desafío considerable en la replantación de viñedos, ya que incluso

después de retirar la planta, las raíces residuales pueden permanecer viables por años. Estas raíces no solo sustentan la supervivencia de los chanchitos blancos, sino que también sirven como reservorio de virus asociados con el complejo de enrollado de la vid (GLRaVs), lo que facilita la conexión entre un viñedo previamente infestado y las nuevas plantaciones, aumentando así el riesgo de reinfección (Almeida *et al.*, 2013).

Además, la infección viral puede alterar ciertas características de la planta, como su color y la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés). Estos cambios fisiológicos y químicos pueden afectar significativamente la atracción de vectores hacia las plantas infectadas. La modificación en la emisión de VOC y otros rasgos visuales inducidos por el virus puede influir en el comportamiento de los chanchitos blancos y otros insectos vectores, incrementando o disminuyendo su afinidad por determinadas plantas en función de su estado de salud (Islam *et al.*, 2020). Este fenómeno resalta la complejidad de las interacciones planta-virus-vector y su importancia en el manejo de enfermedades en cultivos vitícolas.

Estos aspectos son críticos para diseñar estrategias de manejo integrado de plagas (MIP) orientadas a reducir la propagación de virus en viñedos, considerando tanto el comportamiento de los vectores como los cambios inducidos en las plantas infectadas.

5.3. Factores asociados a la transmisión de virus

Factores ambientales como la temperatura y la humedad, junto con la presencia de otros organismos, pueden influir en la eficacia de la transmisión. Estos mecanismos resaltan la importancia de los *coccoídeos* no solo como plagas, sino también como vectores significativos en la propagación de virus que afectan la salud de las plantas y la producción agrícola.

El virus puede mantenerse en el interior de los chanchitos blancos incluso después de la muda posterior a la adquisición, lo que sugiere una capacidad de retención viral en estos insectos tras el cambio de cutícula. Sin embargo, también se ha observado que los chanchitos blancos pueden perder rápidamente su capacidad de transmitir el virus luego de la transferencia inicial, indicando una dinámica compleja de retención y transmisión viral (Díaz-Lara *et al.*, 2023). La eficiencia en la transmisión es variable, con tasas que típicamente oscilan entre el 15 % y el 25 %, aunque tienden a ser mayores inmediatamente después de la alimentación posterior a la adquisición que tras un período de ayuno. Esto sugiere que la reciente ingesta de savia puede influir en la capacidad infectiva de la cochinilla. Además, la temperatura juega un rol importante en la actividad de estos insectos y, por lo tanto, en la eficiencia de transmisión del virus; temperaturas más altas pueden acelerar el metabolismo de los chanchitos blancos, favoreciendo la transmisión. La propagación del virus en el viñedo también puede ocurrir a través de la dispersión aérea de ninfas jóvenes infectadas con GLRaV-3, lo que contribuye a la expansión de la enfermedad en los viñedos (Díaz-Lara *et al.*, 2023).

En cuanto a la interacción entre chanchitos blancos y variedades de uva, algunas variedades son más susceptibles al ataque de estos insectos que otras, aunque esta relación no siempre es predecible. Las investigaciones han demostrado que tanto la cochinilla como el virus pueden ser necesarios para que se presenten síntomas específicos de enfermedad en las plantas, lo cual sugiere una interacción compleja y específica entre el virus, el insecto y la planta.

Además, todos los chanchitos blancos albergan bacterias endosimbióticas, que cumplen un rol esencial en su nutrición al sintetizar aminoácidos que los insectos no pueden producir por sí mismos. La investigación reciente indica que, en otros grupos de insectos fitófagos, como moscas blancas y pulgones, los endosimbiontes bacterianos también pueden ser importantes en la transmisión de virus a las plantas. En estos casos, las proteínas producidas por endosimbiontes *cocoides* parecen facilitar la transmisión

viral, actuando como mediadores entre el virus y el insecto vector. Estos descubrimientos resaltan la importancia de los endosimbiontes no solo en la nutrición de los chanchitos blancos, sino también como posibles facilitadores en la transmisión de virus, lo cual abre nuevas líneas de investigación en el control de enfermedades transmitidas por estos insectos (Díaz-Lara *et al.*, 2023).

5.4. Especies de coccoídeos vectores

***Pseudococcus calceolariae* (Maskell)**: es una especie ovípara que deposita sus huevos en ovisacos algodonosos, pequeños, densos e irregulares. Cada ovisaco puede contener entre 150 y 600 huevos, de los cuales emergen pequeñas ninfas migratorias que se desplazan a diferentes partes de la planta para alimentarse. Durante el período de oviposición, las hembras se repliegan hacia áreas protegidas de la madera. La eclosión ocurre a mediados del invierno en frutales cítricos y a inicios de primavera en carozos y pomáceas (González, 2011).

La fecundidad de las hembras varía según la época del año, el sustrato del que se alimentan (como frutas, brotes o pedúnculos) y la disponibilidad de machos (Salazar *et al.*, 2010).

Las etapas del ciclo de vida de esta especie son huevo, ninfa I, ninfa II, ninfa III y hembra adulta. Por su parte, los machos, al igual que las otras especies de pseudococcidos, posterior al estadio de ninfa II, forman un pupoide, que permite que se produzca la transformación que da lugar al individuo adulto. El tiempo generacional en primavera es significativamente menor que en las hembras, pudiendo alcanzar entre tres a cuatro generaciones en la temporada, dependiendo de las temperaturas y la calidad del sustrato de alimentación (Salazar *et al.*, 2010).

En la Figura 5.1 A se observa una hembra adulta de *Pseudococcus calceolariae*.

***Pseudococcus longispinus* (Targioni y Tozzetti)**: es una especie vivípara, por lo cual la aparición de neonatas se produce bajo una tenue malla de filamentos protectores que emergen lateralmente, formando un techo que cobija a las recién nacidas por un tiempo en los flancos maternos (González, 2011). Cada hembra produce entre 90 a 220 ninfas migratorias, dependiendo de la época del año y la estructura del árbol sobre la cual se alimentan, siendo el período de mayor fecundidad en época estival (Ripa y Larral, 2008). Por su lado, los machos adultos presentan un marcado dimorfismo sexual y capacidad de volar. Ellos no se alimentan y solo viven unas horas con el fin de fecundar a la hembra (Salazar *et al.*, 2010).

En la Figura 5.1 B se observa una hembra adulta de *Pseudococcus longispinus*.

Las etapas del ciclo de desarrollo de esta especie de chanchitos corresponden a: huevo, ninfa migratoria, ninfa I, ninfa II, ninfa III, preadulto y hembra adulta. Los machos por su parte, posterior a la etapa de ninfa II forman un pupoide. Esta estructura tubular está formada por delicados filamentos y en su interior se produce la transformación que dará lugar al macho adulto (Salazar *et al.*, 2010).

***Planococcus citri* (Risso)**: es una especie ovípara, donde las hembras producen entre 300 y 600 huevos dentro de estructuras algodonosas u ovisacos, los cuales pueden ser producidos con o sin la intervención de los machos. En menos de 10 días eclosionan las ninfas migratorias, las cuales se mueven por la planta ubicando sitios de alimentación. Una vez que las ninfas comienzan a alimentarse, secretan cera y producen mielecilla. Las etapas del ciclo de desarrollo corresponden a huevo, ninfa I, ninfa II, ninfa III y hembra adulta. En el caso de los machos, posterior a la etapa de ninfa II, forman una estructura tubular constituida por delicados filamentos llamada pupoide, en cuyo interior el individuo alcanza el estado de macho adulto, el cual solo vive uno o dos días (Salazar *et al.*, 2010).

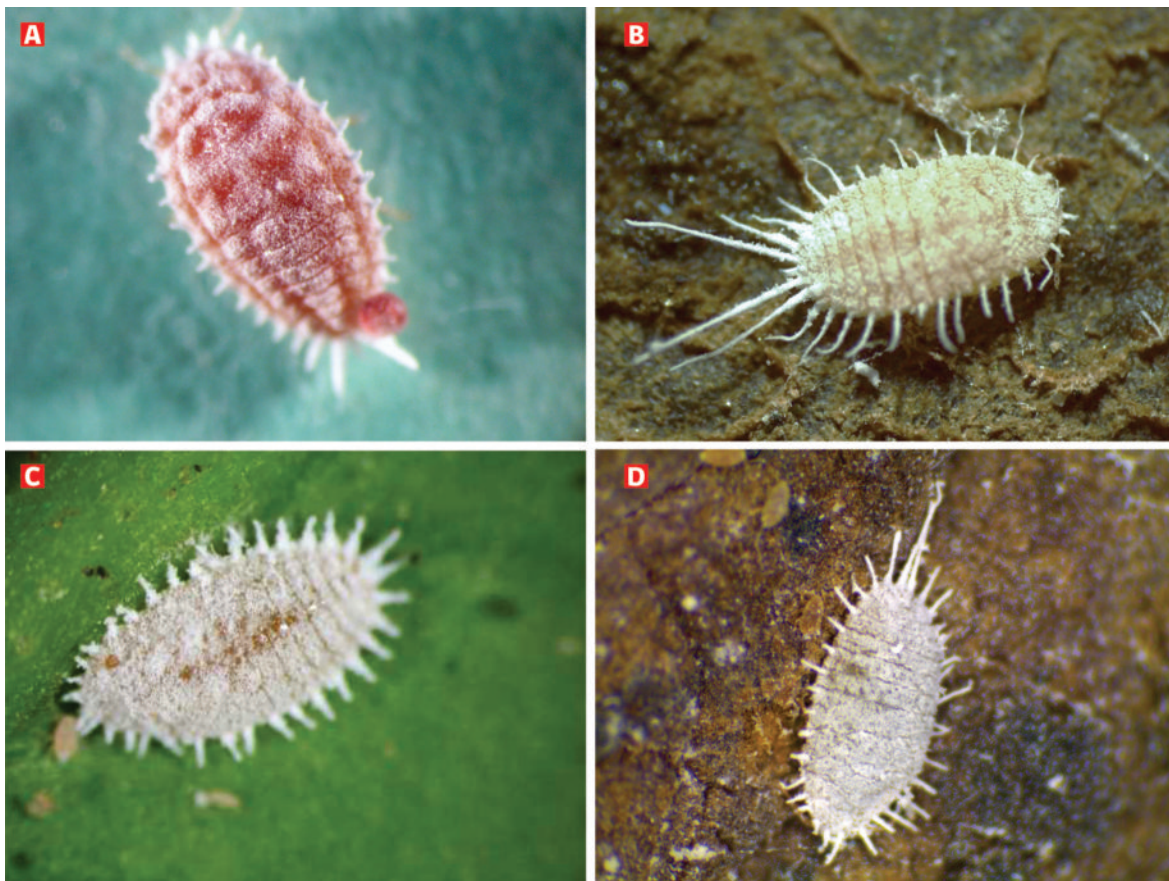


Figura 5.1. Hembras adultas de chanchitos blancos. A: *Pseudococcus calceolariae*, B: *Pseudococcus longispinus*, C: *Planococcus citri*, D: *Pseudococcus viburni*.

Esta especie presenta tres a cuatro generaciones anuales que se superponen, por lo que en cualquier época del año se pueden encontrar todos los estadios, sin embargo, durante el invierno disminuye su densidad siendo más frecuente encontrar masas de huevos. En el verano y otoño se observa la mayor cantidad de machos en las trampas de feromonas, época en que estos se aparean con las hembras, aunque esto no es requisito para producir la descendencia (Ripa y Larral, 2008).

Las hembras jóvenes de la generación invernal comienzan a movilizarse desde fines de agosto, diseminándose en el follaje en el periodo previo al inicio de la floración. En diciembre, gran parte de la población ya se encuentra como hembra fertilizada, comenzando a formar los ovisacos, que no albergan más de 120-130 huevos, siendo el periodo de nacimiento de la primera generación de neonatas primaveral. Ellas luego se mueven a las hojas jóvenes, estableciéndose en ambas caras y en frutos nuevos (González, 2011). Muy importante en su biología es la temperatura de eclosión de los huevos invernantes, ubicados bajo la corteza suelta. En junio, los primeros estadios ninfales se instalan en la madera desde mucho antes de la brotación primaveral. Las hembras adultas se localizan preferentemente en frutos que están en contacto entre sí, hojas, ramas o grietas, donde realizan la ovipositora (Ripa y Larral, 2008).

En la Figura 5.1 C se observa una hembra adulta de *Planococcus citri*.

***Pseudococcus viburni* (Signoret):** se reproduce sexualmente en huertos frutales y viñedos. La hembra deposita en su extremo caudal un grupo de 200 a 300 huevos de coloración amarilla, en ovisacos ce-

rosos desde donde emergen y dispersan ninfas migratorias, las cuales se fijan en la capa más interna del ritidomo (o corteza en la vid) cercana al floema donde se alimentan, protegen y, eventualmente, se dispersan a otras estructuras de la planta. En primavera y/o verano también colonizan el envés de las hojas, tallos, raquis y bayas (Salazar *et al.*, 2010).

Luego de la postura de huevos, el ciclo continúa con tres estadios ninfales para la hembra que culminan en la forma adulta. En el caso de los machos, después del segundo estadio de ninfal, construyen un capullo blanco sedoso que protege los estadios de prepupa y pupa, que los llevarán a mudar a su estado adulto alado que se apareará con la hembra (Salazar *et al.*, 2010).

Después de la cosecha, la fruta remanente o pámpanos muestran por lo general un aumento de ninfas migratorias y huevos, sin embargo, a medida que transcurre el invierno la densidad de la plaga decrece en la parte aérea de la planta y se concentra en la base del tronco bajo el ritidomo, cerca del suelo o bajo él. Esta mortalidad puede deberse, entre otros factores, a la dificultad de los insectos para alimentarse de la savia en la madera de vides en receso (Salazar *et al.*, 2010).

En cada temporada se pueden observar tres generaciones superpuestas: huevos, estados ninfales y adultos, cuya proporción y densidad varía según el huerto, condiciones climáticas, métodos de control, fertilización, entre otros. En parronales sin intervención de plaguicidas, la máxima densidad se observa por lo general en marzo y abril, período de cosecha en las variedades tardías. Con el inicio de la caída de hojas de la vid, la densidad decrece paulatinamente alcanzando un mínimo entre julio y agosto. En las condiciones ambientales del Norte Chico, esta especie no presenta diapausa invernal, es decir, se presentan tres generaciones que se traslapan, encontrando a lo largo del año todos los estados de desarrollo. Las mayores poblaciones ocurren entre enero y marzo, período de mayor infestación de los frutos.

En la Figura 5.1 D se observa una hembra adulta de *Pseudococcus viburni*.

***Planococcus ficus* (Signoret):** es una especie importante del floema de la vid, encontrándose bajo el ritidomo desde la corona hasta el cuello del tronco, zona en la cual inverte como hembra adulta fecundada. Las oviposiciones ocurren en primavera, de preferencia en el pedicelo y bayas de racimos muy agrupados, produciendo abundante mielecilla que favorece el desarrollo de fumagina en su generación de verano. Los ovisacos, que contienen cientos de huevos amarillentos, se disponen como una débil envoltura extendiéndose hacia atrás por no más del 60 % del cuerpo de la hembra. La primera generación aparece a mediados de mayo con la aparición de las ninfas, las que migran a la base de los brotes en crecimiento, haciéndolas difíciles de ver.

Entre finales de junio y principios de julio aparece la segunda generación, que invade progresivamente los brotes y raquis de los racimos. Entre su primera y segunda generación primaveral, las ninfas comienzan a ascender para ubicarse en el follaje después de la floración, donde se instalarán aisladamente en ambas caras de las hojas para iniciar sus primeras oviposiciones (González, 2011). A finales de agosto aparece una tercera generación, responsable de los mayores daños dentro del viñedo. Finalmente en otoño, después de la cosecha, las hembras fecundadas se colocan bajo el ritidoma para pasar el invierno (González, 2011; Guariso *et al.*, 2014).

Las hembras de *P. ficus* tienen un desarrollo heterometábolo y tras la eclosión de los huevos, pasan por tres estadios ninfales hasta alcanzar el estado adulto. En cambio, los machos se caracterizan por un desarrollo holometábolo con cuatro estadios inmaduros. La metamorfosis se lleva a cabo en un pequeño pupario donde se desarrollan los dos últimos estadios ninfales para dar lugar al adulto, que posee un aparato bucal atrofiado y puede vivir de uno a tres días (Estopá, 2015).

***Parthenolecanium corni* (Bouché)**: es una especie bivoltina, partenogenética, principalmente, y ovípara, con dos períodos de oviposición en uva de mesa: entre octubre y comienzos de noviembre, y entre enero y febrero. Las hembras ponen los huevos (de color blanco o rosado) en una cámara de cría debajo de su abdomen e invernán en la madera como ninfa de segundo estadio, alcanzando su madurez sexual muy rápido a finales de septiembre. Después de la eclosión, las ninfas de primer estadio (rastreras) se mueven desde debajo de la cubierta femenina sobre la superficie de la planta, donde se dispersan sobre las hojas nuevas, asentándose en racimos y márgenes exteriores de las hojas superiores (González, 1989). La intensa actividad de las ninfas migratorias puede durar desde horas incluso hasta unos días. Después de asentarse y pasar por la primera muda, se mueven con menos frecuencia. Al final del verano, el segundo estadio se encuentra principalmente en la parte inferior de la superficie de las hojas, tallos y ramas. En el otoño, antes de la caída de las hojas, las ninfas del segundo estadio migran desde las hojas hasta las partes leñosas de la planta, para pasar el invierno (Marotta y Tranfaglia, 1997) (Figura 5.2).

La proporción de sexos en las poblaciones es extremadamente variable y aparentemente depende de las condiciones de alimentación (Borges da Silva *et al.*, 2016).



Figura 5.2. Hembras adultas de conchuela café europea de la vid *Parthenolecanium corni*.

5.5. Estrategias de gestión de coccoídeos en vides

Entre los vectores, los coccoídeos, en sus primeras fases ninfales, son particularmente propensos a la propagación pasiva. Estos insectos pueden ser transportados por el viento, por la ropa y el equipo de los trabajadores, e incluso por aves, lo que subraya la importancia de adoptar prácticas estrictas de bioseguridad en el campo (Díaz-Lara *et al.*, 2023). Por esta razón, el diseño de nuevas plantaciones debe tener en cuenta el estado sanitario de los viñedos vecinos y el riesgo de dispersión de vectores. Se han propuesto prácticas como la implementación de barreras físicas, incluyendo setos o franjas sin vides entre parcelas, además del uso de insecticidas selectivos, para minimizar la transmisión de vectores desde viñedos más antiguos a plantaciones jóvenes. Estas medidas preventivas buscan aislar las áreas de propagación de plantas madre y protegerlas de fuentes externas de infestación, contribuyendo a un control más efectivo a largo plazo (Almeida *et al.*, 2013).

Las variaciones en sus preferencias de ubicación en la vid, el número de generaciones por temporada y su capacidad para transmitir virus exige un enfoque de control integrado que incluya el uso de material de propagación libre de virus, enemigos naturales e insecticidas (de contacto y sistémicos) (Díaz-Lara *et al.*, 2023).

El uso de material propagativo en buen estado sanitario, como esquejes, injertos, yemas, esquejes enraizados y plantas injertadas, es fundamental para mitigar el impacto de las enfermedades virales en los cultivos de vid, especialmente en áreas donde existen vectores que facilitan su propagación. La producción y empleo de material certificado y libre de virus reduce significativamente el potencial de inóculo, actuando como una medida profiláctica que contribuye a un manejo preventivo efectivo en el viñedo (Martelli, 2006). En casos de infestaciones, es posible eliminar plantas infectadas y reemplazarlas con material tolerante a vectores, lo cual ayuda a disminuir tanto la incidencia como la propagación, mitigando así su impacto en la producción (Fuchs, 2020).

Además, se debe evitar el movimiento frecuente de maquinaria y equipo entre viñedos, ya que esta práctica puede facilitar la dispersión de los chanchitos blancos. Los pesticidas en aerosol aplicados como parte de programas de manejo regionales pueden ser útiles para controlar la diseminación de vectores, aunque no siempre logran detener la transmisión del virus, lo que indica la necesidad de mejorar la integración de estas prácticas en los sistemas de control regionales (Maree *et al.*, 2013).

Algunas especies de chanchitos blancos, como *Ps. calceolariae* y *Pl. ficus*, pueden establecerse en las raíces de la vid, lo que representa un reto adicional en el manejo. Las raíces remanentes de vides eliminadas pueden albergar tanto virus como chanchitos blancos, y estos organismos pueden sobrevivir por años, lo que incrementa el riesgo de infección en nuevas plantaciones en el mismo sitio. Este problema de "remanencia" exige métodos de preparación del suelo y limpieza profundos para asegurar que no queden residuos infecciosos que puedan comprometer las nuevas vides (Almeida *et al.*, 2013).

La detección y eliminación oportuna de vides infectadas, junto con un sistema de monitoreo constante, son prácticas indispensables para controlar el avance de las infestaciones de coccoídeos. En el caso específico de los chanchitos blancos, el monitoreo se realiza mediante bandas de cartón corrugado de 20 cm de ancho, colocadas a 120 cm del suelo alrededor del tronco de las vides. En cada muestreo, se cuentan los individuos presentes bajo el cartón y entre las capas de papel corrugado (Figura 5.3). Esta técnica facilita la detección temprana y permite un manejo eficiente de la población de estos insectos en el campo.



Figura 5.3. Trampa de agregación para monitoreo de chanchitos blancos en huertos de vides.

En Chile, se ha documentado la presencia de diversas especies de depredadores y parasitoides que juegan un papel importante en el control biológico de los chanchitos. Estos agentes de control biológico ayudan a regular las poblaciones, limitando su propagación y reduciendo la necesidad de intervenciones químicas. Entre los depredadores más relevantes se encuentran los dípteros de los géneros *Leucopis* y *Ocyptamus confusus*, y los neurópteros *Chrysoperla* sp. y *Sympherobius marmoratipennis*, conocidos por su capacidad para consumir grandes cantidades de chanchitos blancos en sus estadios juveniles. Adicionalmente, el coccinélido *Cryptolaemus montrouzieri*, es un depredador altamente efectivo utilizado en estrategias de control biológico alrededor del mundo debido a su voracidad (Olivares *et al.*, 2014).

Por otro lado, los parasitoides que han mostrado efectividad en el control de los chanchitos blancos incluyen varias especies de avispa encírtidas. Entre ellas destacan *Coccidoxenoides peregrina*, *Leptomastidea abnormis*, *Leptomastix dactylopii*, *Tetracnemoidea brevicornis* y *Cocophagus gurneyi*. Estas especies atacan a los chanchitos blancos en distintos estadios de su ciclo de vida, impidiendo su desarrollo y reproducción. En Chile, el uso de parasitoides representa una herramienta clave en el manejo de plagas, ya que estos insectos pueden adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas y ser incorporados en programas de manejo integrado sin causar daños significativos a otros organismos no objetivo (Olivares *et al.*, 2014).

En Nueva Zelanda, el uso de parasitoides específicos ha demostrado ser altamente exitoso en el manejo de ciertas especies de chanchitos blancos. Un ejemplo notable es el control de *Ps. viburni*, que se ha logrado mediante la liberación de *Acerophagus maculipennis*, un parasitoide especializado que reduce considerablemente las poblaciones de esta plaga. Sin embargo, en el caso de especies como *Pl. citri* y *Pl. ficus*, el parasitoide *Anagyrus pseudococci*, aunque efectivo, no ha sido suficiente para disminuir la transmisión de virus. Esto ha llevado a la exploración de métodos alternativos, como la disrupción del apareamiento, una técnica que consiste en la liberación de feromonas para confundir a los machos e impedir que localicen a las hembras. Este método se está evaluando como un complemento en el manejo de *Pl. ficus*, especialmente durante períodos de baja densidad de la plaga, cuando su efectividad es mayor (Almeida *et al.*, 2013).

Otro aspecto relevante es el manejo de las hormigas que "cultivan" a los chanchitos blancos, como es el caso de la hormiga argentina (*Linepithema humile*). Esta hormiga fomenta la proliferación de chanchitos blancos en viñedos de California, lo que plantea un desafío importante, pues actúa como defensora de estos contra sus enemigos naturales, dificultando su control. Se han realizado esfuerzos de investigación para desarrollar programas de manejo regional, los cuales combinan múltiples herramientas y han mostrado resultados prometedores al reducir de manera más sostenida las poblaciones de chanchitos blancos y virus en áreas extensas, comparados con los esfuerzos de productores individuales (Almeida *et al.*, 2013).

En los viñedos, el control químico se aplica en épocas críticas, como en la etapa de cuaja de la fruta, principalmente mediante el uso de insecticidas neonicotinoides y reguladores de crecimiento. Los neonicotinoides son eficaces debido a su acción sistémica, ya que actúan en el sistema vascular de la planta y, al ser ingeridos por el insecto, generan una alta tasa de mortalidad. Sin embargo, los insecticidas sistémicos no siempre ofrecen una protección completa, ya que para que actúen, los chanchitos blancos deben alimentarse de la planta. Este método, si bien reduce significativamente las poblaciones de la plaga en el viñedo tratado, no garantiza que se detenga la propagación de virus cuando estos insectos se desplazan a plantas sanas. Así, el control químico a menudo requiere complementarse con medidas de manejo biológico y cultural para lograr una supresión efectiva de las poblaciones de chanchitos blancos en el largo plazo (Almeida *et al.*, 2013).

5.6. Bibliografía

- Ahmed, A. R., Apori, S. O., & Karim, A. A. (2023). Mealybug vectors: A review of their transmission of plant viruses and their management strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 8(3), 736–761. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2023040>
- Almeida, R. P. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Herrbach, E., & Pietersen, G. (2013). Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers In Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>
- Borges da Silva, E., Amandio Cruz, M., Botelho, M., Franco, J., Ribeiro, H. and A. Mexia. (2016). *Parthenolecanium corni* (Bouche) (Hemiptera Coccidae) in vineyards in Portugal: morphology, seasonal development, life cycle and reproduction. *Redia*, XCIX: 215–217. <http://dx.doi.org/10.19263/REDIA-99.16.28>
- Cabaleiro, C., & Segura, A. (1997). Field transmission of Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, 81(3), 283–287. <https://doi.org/10.1094/pdis.1997.81.3.283>
- Charles, J., Cohen, D., Walker, J., Forgie, S., Bell, V., & Breen, K. (2006). A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV3). *Proceedings Of The New Zealand Weed Control Conference*, 59, 330–337. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2006.59.4590>
- Díaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H., Monjarás-Barrera, J. I., Vončina, D., Erickson, T. M., & Rwahni, M. A. (2023). Potential implications and management of grapevine viruses in Mexico: A Review. *International Journal of Plant Biology*, 14(1), 177–189. <https://doi.org/10.3390/ijpb14010015>
- Estopá, L. (2015). Control biológico de la cochinilla algodonosa de la vid *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) en uva de mesa en el Valle del Vinalopó. Influencia y manejo de las hormigas. Valencia, España. Disponible en <https://riunet.upv.es/handle/10251/64258>
- Fundación para el Desarrollo Frutícola y Fundación para la Innovación Agraria. (2004). Uva de mesa : Guía de monitoreo de plagas. <https://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/145633>
- Fuchs, M. (2020b). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal Of Plant Pathology*, 102(3), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2>
- González R., Roberto (1989). Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Santiago, Chile: Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/31283>
- González H., Roberto (2011). Pseudococcidos de importancia frutícola en Chile (Hemiptera: Pseudococcidae) [en línea]. Santiago: Serie Ciencias Agronómicas – Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/58154>
- González R., Roberto (2016). Insectos Coccoideos plagas de cultivos frutales en Chile (Hemiptera: Coccoidea) [en línea]. Santiago: 2da edición. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/62351>
- Golino, D., Weber, E., Sim, S., & Rowhani, A. (2008). Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard. *California Agriculture*, 62(4), 156–160. <https://doi.org/10.3733/ca.v062n04p156>

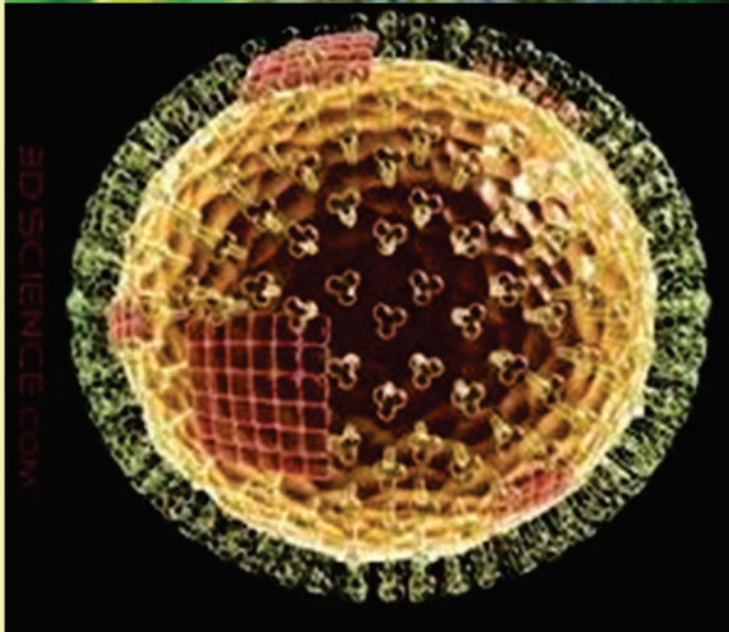
- Guario, A., Cavicchi, V., Lasorella, V., Antonino, N., Grande, O. y Convertini, S. (2014). La confusione sessuale per il controllo di *Planococcus ficus* su vite da tavola, in puglia: primi approcci di un biennio di sperimentazione. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 1, 177-182. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/282575129>
- Gullan, P. J., & Kosztarab, M. (1997). Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 23-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.23>
- Hommay, G., Beuve, M., & Herrbach, E. (2022). Transmission of Grapevine Leafroll-Associated Viruses and Grapevine Virus A by Vineyard-Sampled Soft Scales (*Parthenolecanium corni*, Hemiptera: Coccidae). *Viruses*, 14(12), 2679. <https://doi.org/10.3390/v14122679>
- Islam, W., Noman, A., Naveed, H., Alamri, S. A., Hashem, M., Huang, Z., & Chen, H. y. H. (2020). Plant-insect vector-virus interactions under environmental change. *The Science of The Total Environment*, 701, 135044. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135044>
- Mahfoudhi, N., Digiario, M., & Dhouibi, M. H. (2009). Transmission of Grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Disease*, 93(10), 999-1002. <https://doi.org/10.1094/pdis-93-10-0999>
- Maree, H. J., Almeida, R. P. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E. C., Martelli, G. P., Naidu, R. A., Rowhani, A., Saldarelli, P., & Burger, J. T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers In Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>
- Marotta, S., y Tranfaglia, A. (1997). Biology. General life history. En *Soft scale insects - Their biology, natural enemies and control* (pp. 251-255)
- Martelli, G.P., y Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches*, 55. Disponible en <http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=800521>.
- Mathulwe, L., Malan, A., & Stokwe, N. (2021). A Review of the Biology and Control of the Obscure Mealybug, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic Fungi and Nematodes. *African Entomology*, 29(1). <https://doi.org/10.4001/003.029.0001>
- Miller, D., and J. Davidson. 2005. Armored scale insect pests of trees and shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Comstock Publishing Associates. Cornell University Press, Ithaca and London. 440 p
- Olivares P., Natalia, Luppichini B., Paola, Volosky, Christian (eds.) (2014). Plagas de los cítricos: reconocimiento y manejo [en línea]. La Cruz, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 282. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7686>
- Ripa, R., Larral, P., Luppichini, P., Guajardo, V. y S. Rojas. (2008). Chanchitos blancos. En *Manejo de plagas en paltos y cítricos. Colección de libros INIA N°23*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, (pp. 155-162).
- Salazar, A., Gerding, M., Luppichini, P., Ripa, R., Larraín, P., Zaviezo, T., y Larral, P. (2010). Biología, manejo y control de chanchitos blancos. *Boletín INIA N° 204*. 62 p. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7344>
- Tsai, C.-W., Rowhani, A., Golino, D.A., Daane, K., y Almeida, R.P. (2010). Mealybug Transmission of Grapevine Leafroll Viruses: An Analysis of Virus-Vector Specificity. *Phytopathology*, 100(8), 830-834. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0830>



Nemátodos transmisores de virus en vid

Capítulo

6



Capítulo 6

Nemátodos transmisores de virus en vid

Claudio Salas F.

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Carol Krausz B.

Ingeniera Agrónoma, Magíster.

Los nemátodos, pertenecientes al Phylum Nematoda, son organismos eucariotas pluricelulares, invertebrados y no segmentados, que se encuentran ampliamente distribuidos en todo tipo de suelos, incluidos cultivos y regiones extremas como la Antártida, ya que poseen una gran adaptabilidad, siendo la condición más importante para mantener su actividad, contar con un medio húmedo (Magunacelaya y Dagnino, 1999). Pueden ser de vida libre o parásitos, abarcando un total de 26.646 especies identificadas, de las cuales 4.105 son fitoparásitos; éstos representan entre el 10 % y 20 % de los nemátodos totales en muestras de suelo natural (Guzmán *et al.*, 2012). Pertenecen a dos órdenes dentro del Phylum Nematoda: el orden Tylenchida, que contiene a la mayoría de los nemátodos fitoparásitos, algunos parásitos de insectos y algunas especies que se alimentan de hongos, y el orden Dorylaimida, con una gran variedad de nemátodos de suelo, donde se incluyen tres géneros fitoparásitos (Dropkin, 1980).

Los nemátodos fitoparásitos pueden habitar en cualquier parte de las plantas, incluyendo brotes y flores en desarrollo, hojas, tallos y principalmente raíces, destacando por su impacto negativo en la agricultura, a través de tres importantes vías: pueden dañar directamente las plantas por medio de su alimentación; pueden generar un daño indirecto a través de la generación de heridas con sus estiletes, lo que implica una vía de entrada de patógenos y, por último, actuar como vectores de virus fitopatógenos. Esta triple función puede debilitar cultivos importantes, como los frutales y las vides (Sepúlveda, 2003; Krausz, 1997).

Abordando su actuar como vectores de virus, los géneros de nemátodos que destacan en la agricultura pertenecen a los géneros *Xiphinema*, *Longidorus*, *Paralongidorus*, *Trichodorus* y *Paratrachodorus*, capaces de inocular virus en los tejidos vasculares de las plantas mediante estiletes especializados de los tipos odontoestilete y estilete curvo, cuyas características morfológicas, sumado a su hábito de vida libre en el suelo, permiten una activa transmisión. Por ejemplo, *Xiphinema index*, que posee un odontoestilete, transmite el virus de la hoja de abanico de la vid y *Trichodorus* spp., que poseen estilete curvo, el virus del moteado del tabaco. Los nemátodos vectores de virus identificados en Chile pertenecen a tres géneros: *Xiphinema*, *Longidorus* y *Trichodorus*, sobresaliendo principalmente los del género *Xiphinema* en frutales y vides (González, 1993).

La interacción entre nemátodos y virus constituye un desafío crítico para la sanidad vegetal, pues su presencia en el suelo facilita la propagación de enfermedades virales en los cultivos. Comprender su biología, dinámica y mecanismos de transmisión es clave para desarrollar estrategias de manejo que minimicen su impacto económico en la agricultura.

6.1. Características generales de los nemátodos fitoparásitos transmisores de virus: ciclo de vida, comportamiento y hábitos alimenticios

El ciclo de vida de la mayoría de los nemátodos fitoparásitos es, por lo general, bastante semejante y se divide en seis estadios: huevo, cuatro etapas larvarias o juveniles (J1, J2, J3 y J4) y adulto. La primera muda a menudo se produce dentro del huevo. Los huevos se incuban y se desarrollan en larvas o juveniles, cuya apariencia y estructura es comúnmente similar a la de los nemátodos adultos en aquellos individuos de vida libre. El estadio J1 se forma siempre dentro del huevo, eclosionando el estadio J2 que se dedicará a buscar a su huésped. Sin excepción, todas las especies son vermiformes en sus estados J1 y J2. Las larvas aumentan de tamaño y cada etapa larvaria concluye mediante una muda. Después de la última muda, los nemátodos se diferencian en hembras y machos adultos. En algunas especies, las hembras cambian de forma a medida que van madurando y toman formas de pera o intermedias entre vermiformes y peras. Las distintas formas que adquieren los adultos permiten la identificación de los diferentes géneros de nemátodos fitoparásitos (France, 2000).

La hembra puede producir huevos fértiles una vez que se ha apareado con un macho o, en ausencia de machos, partenogenéticamente, o bien produce esperma por sí misma (hermafroditismo) (Peña y Páez, 2014). En el caso de nemátodos transmisores de virus, todos poseen el ciclo de seis estadios, manteniendo su forma vermiforme en todas sus etapas juveniles y adulto.

Desde el punto de vista del hábito de vida de los nemátodos, se distinguen aquellos que son ectoparásitos, vale decir que se desarrollan fuera de su hospedero, siempre en la solución de suelo y aquellos endoparásitos, que desarrollan parte de su ciclo en el interior de su hospedero. En el caso de los nemátodos transmisores de virus, todos tienen un hábito de ectoparasitismo, por lo cual a través de su vida libre, tienen un fuerte impacto en la transmisión de partículas virales, al pinchar con su estilete un hospedero y repetir la misma acción en otras plantas.

El daño directo de nemátodos sobre las plantas, consiste en la perforación profunda de las puntas de las raíces, a través de una estructura que se proyecta a través del aparato bucal y que se denomina estilete, estructura hueca tipo lanza, con la cual los nemátodos perforan las paredes celulares para succionar el contenido citoplasmático de las células vegetales (Dropkin, 1980). Existen 3 tipos de estiletes asociados a nemátodos fitoparásitos, cuya arquitectura es diferente y que les otorga características especiales al momento de alimentarse de sus hospederos. Al respecto, Krausz (1997) describe que existen los estomatoestiletes (Figura 6.1 A), odontoestiletes (Figura 6.1 B) y estiletes curvos (Figura 6.1 C), siendo los dos últimos, conocidos por su alta capacidad de transmitir partículas virales en sus hospederos.

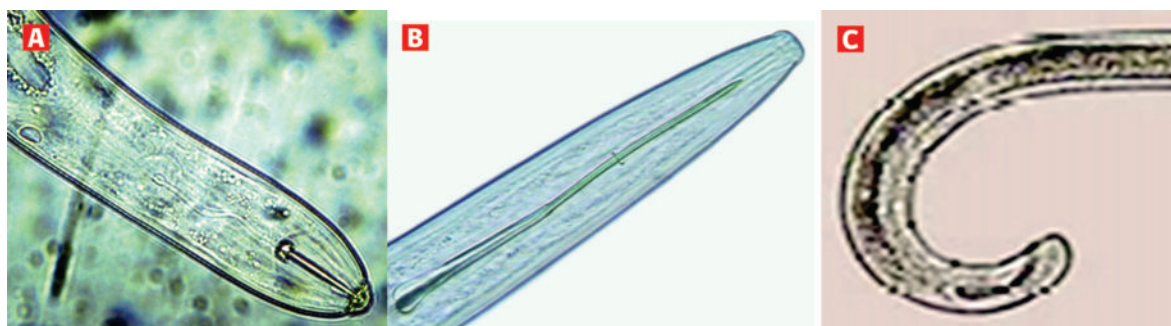


Figura 6.1. Tipos de estilete en nemátodos fitoparásitos: A: Estomatoestilete; B: Odontoestilete; C: Estilete curvo.

La mayoría de los daños causados por nemátodos fitoparásitos parece deberse a la secreción de saliva introducida en los tejidos de las plantas durante el proceso de alimentación. Ellos perforan la pared celular, introducen saliva dentro del citoplasma, extraen parte del contenido celular, y se movilizan en unos pocos segundos. El proceso de alimentación causa una reacción en las células de las plantas afectadas, resultando en la muerte o debilitamiento de los extremos de las raíces y yemas, formación de lesiones y rompimiento de tejidos, abultamientos, agallas, arrugamiento y deformación en tallos y hojas. Algunas de estas manifestaciones son causadas por la descomposición del tejido afectado por las enzimas del nemátodo, las cuales, con o sin la ayuda de metabolitos tóxicos, causan desintegración del tejido y muerte de las células. Otros síntomas asociados dicen relación con el alargamiento anormal de las células (hipertrofia), por supresión de la división celular o por la estimulación del proceso de división celular de una manera descontrolada y que resulta en la formación de agallas (hiperplasia) o de un gran número de raíces laterales en o cerca de los sitios de infección (Peña y Páez, 2014).

6.2. Nemátodos como vectores de virus en vid y mecanismos de transmisión

Los nemátodos fitoparásitos dañan las raíces de las plantas de vid reduciendo su capacidad de absorción de agua y nutrientes disponibles en el suelo. Por tratarse de parásitos muy pequeños, normalmente pasan desapercibidos, así como el daño que producen, hasta que se expresan en la parte aérea de la vid, con pérdida de vigor, reducción de largo de brotes, entrenudos cortos, hojas más pequeñas, clorosis, menor tamaño de racimos, menor diámetro de bayas, marchitamiento en horas de mayor temperatura, reducción de síntesis de hormonas como la citoquinina, y a través de la transmisión de virus (Magunacelaya *et al.*, 2004).

Considerando este último punto, se describen dos grupos de virus transmitidos por nemátodos; los tobravirus, que son transmitidos por nemátodos trichodoridos (*Trichodorus* y *Paratrichodorus*), que no revisten importancia en vides, y los nepovirus, que sí tienen importancia en frutales y vides. De estos, se conoce que 12 especies de las 36 descritas de nepovirus, son transmitidas por nemátodos Longidóridos (*Longidorus* spp y *Xiphinema* spp) y de éstas, nueve afectan la vid (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

Los juveniles y adultos de nemátodos vectores son capaces de transmitir los virus asociados a ellos. Mediante el estilete con el que se alimentan, tanto los juveniles como los adultos pueden adquirir y transmitir los virus, pero estos no pueden pasar a través de las mudas larvarias o huevos; después de cada muda los juveniles o adultos resultantes deberán alimentarse de las raíces de una planta enferma para adquirir nuevamente el virus y poder transmitirlo (Velázquez *et al.*, 2015).

En el mismo sentido, Arias (1983), agrega que los virus no permanecen en el nemátodo después de la muda, puesto que el lugar de retención en *Longidorus*, es la cutícula interna del estoma, estilete y vaina del mismo, que cambia junto a la cutícula externa en el proceso de muda. En *Xiphinema* y *Trichodorus*, la retención se realiza en la cutícula que tapiza la pared interna del esófago, que no cambia con la muda, pero se ha observado al microscopio electrónico, que en *Xiphinema* ocurren cambios estructurales considerables durante el proceso de muda, en los que la pared del esófago pasa al intestino juntamente con las partículas de virus que puedan estar retenidas en ella, por lo que, después de cada muda, la pared esofágica aparece libre de virus y, por lo tanto, no es infectiva. La última fase del proceso de transmisión es la inoculación de las partículas de virus en las células de las plantas; solamente se produce la transmisión cuando las partículas de virus se inoculan en células no dañadas o afectadas por el nemátodo, ya que el virus es incapaz de replicarse en ellas o pasar a la célula adyacente. La inoculación se efectúa cuando las partículas de virus entran, con la saliva del nemátodo, en las células de la planta en una interfase en la que lo permita la especificidad de transmisión.

6.3. Especies de nemátodos vectores de virus en la vid

La primera asociación comprobada de nemátodos y virus fue descrita por Hewitt y colaboradores en el año 1958, mostrando a *Xiphinema index* como vector del virus de la hoja en abanico (GFLV) (Decraemer y Chaves, 2012).

Se han reportado 22 nemátodos longidoridos y 14 trichodoridos como vectores de virus de vegetales. Entre los longiodóridos, 11 especies pertenecen a *Xiphinema*, 10 a *Longidorus* y 1 a *Paralongidorus*. Dentro de los trichodoridos, 5 especies corresponden a *Trichodorus* y 9 a *Paratrichodorus*. (Magunacelaya y Dagnino, 1999). Cabe destacar que todos estos géneros poseen hábito de vida libre en el suelo, comportándose como ectoparásitos en sus hospederos.

6.3.1. *Xiphinema* spp. (Nemátodos Daga)

Los Nemátodos Daga (Figura 6.2 A), son el único vector natural de los nepovirus, que adquieren al alimentarse de las plantas; corresponden a nemátodos de gran longitud llegando a medir desde 1,3 hasta 5,5 mm o más. Poseen un estilete largo del tipo odontoestilete (Figura 6.2 B), recto y delgado de 60 a 250 µm con la base expandida (sin nódulos basales), donde se adhieren los músculos.

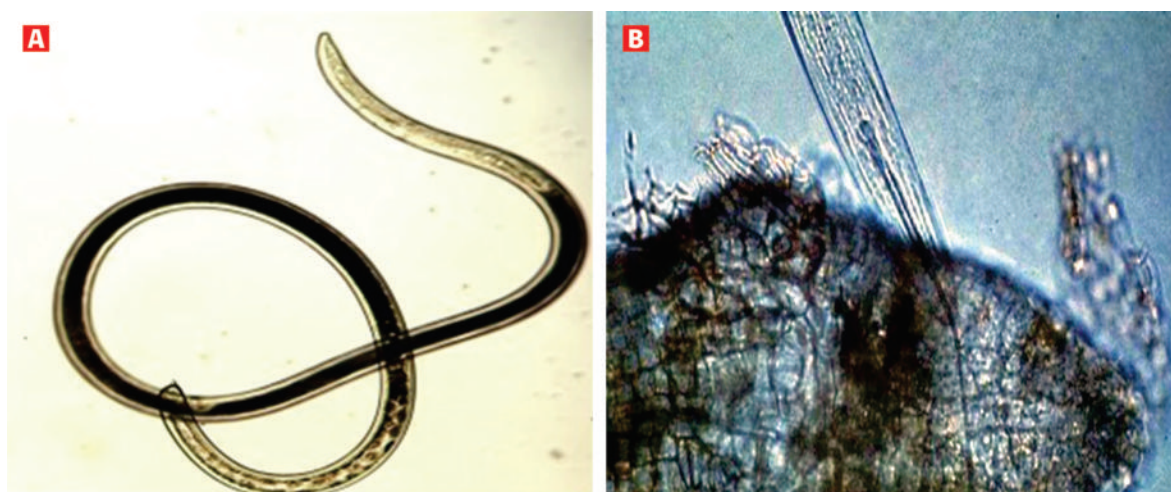


Figura 6.2. A: Morfología *Xiphinema* spp; B: Odontoestilete inserto en un ápice radicular.

Dentro de las especies del género *Xiphinema* destacan *X. index*, asociada principalmente al cultivo de la vid, donde puede ocasionar daño directo con su actividad fitoparásita y al ser vector del virus de la hoja de abanico (Grapevine fanleaf virus, GFLV); *X. americanum sensu lato*, vector del virus de la mancha anular del tomate (Tomato ringspot virus, ToRSV), un importante nepovirus que afecta la vid, sin embargo, su capacidad de transmitir virus a cultivos agrícolas ha sido muy poco estudiada en nuestro país y, por último, *X. diversicaudatum*, especie de nemátodo no presente en Chile, que es capaz de transmitir dos virus importantes para el cultivo de la vid: el virus del mosaico del Arabis (Arabis Mosaic virus, ArMV) y el virus de la mancha anular de la fresa (Strawberry latent ringspot virus, SLRV).

En Chile, *Xiphinema index*, el más importante del grupo, se ha determinado desde la Región de Atacama hasta la Región de La Araucanía, asociado principalmente a un gran número de variedades de vides, tanto de uva de mesa, pisquera y vinífera. Se lo ha encontrado, además, asociado a higueras y moras.

Esta especie es el vector del virus de la hoja en abanico (GFLV) presente en Chile (González, 1993). GFLV corresponde al nepovirus de mayor importancia económica, con pérdidas en vides que pueden sobrepasar el 60 %. Este virus puede permanecer viable en el vector *X. index* por al menos ocho meses, bastando una simple y breve alimentación sobre las raíces, para la adquisición del virus. El virus no se dispersa en alto grado, debido a la escasa movilidad que tienen los nemátodos, sin embargo, es el material de propagación el que permite su dispersión mayor (Herrera, 2000).

Este nemátodo se encuentra de preferencia en suelos con texturas livianas o medias y se caracteriza por una gran longevidad, con ciclos de vida que duran entre 6 y 8 meses a 20 a 23 °C. El resultado de los ataques por *Xiphinema* corresponde a reducciones en el crecimiento de las raíces; estas al ser afectadas, van adquiriendo formas de crochet o ganchos (France, 2000), siendo el umbral de daño para este nemátodo en vides, de 100 juveniles/250 cc de suelo. Algunos individuos pueden quedar inmóviles por un día entero, alimentándose intermitentemente de la misma zona radicular, lo que provoca detención del crecimiento y deformaciones de los ápices radiculares, y la expresión del virus transmitido en la parte aérea (Figuras 6.3 y 6.4).

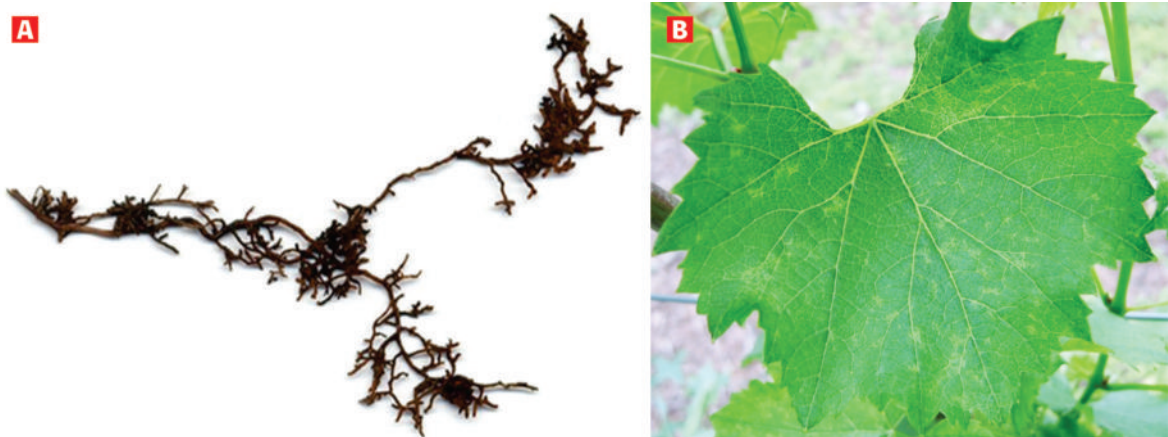


Figura 6.3. A: Daño de *X. index* en raíces de vid; B: Expresión del virus GFLV en hojas, transmitido por *X. index*.



Figura 6.4. Vista general de parrones de uva de mesa de exportación afectados por virosis transmitida por *X. index*, sector Mialqui, comuna de Monte Patria, Región de Coquimbo.

En el caso de *Xiphinema americanum* está ampliamente distribuido en el país, desde la Región de Arica y Parinacota a la Región de Los Lagos, asociado a una gran diversidad de cultivos, cereales, hortalizas hasta forestales, como a un sinnúmero de especies frutales incluyendo a la vid, en cuyo caso *Xiphinema americanum sensu lato* puede actuar como vector en la propagación de tres virus; el virus de la mancha anular del tabaco (Tobacco ringspot virus, TRV), virus de la mancha anular del tomate (Tomato ringspot virus, ToRSV) y el virus del mosaico arrosado del durazno (Peach rosette mosaic virus, PRMV); mientras que *Xiphinema americanum sensu stricto* sólo transmite las dos primeras especies de virus (Andret-Link *et al.*, 2017). De todos estos virus, en Chile sólo ha sido reportada la presencia del virus Tomato ringspot virus.

Por último, *Xiphinema diversicaudatum* es actualmente un nemátodo que no está presente en Chile, sin embargo, su distribución es muy amplia en Europa, existen algunas identificaciones puntuales en California (Estados Unidos) y presencia restringida en un área determinada en Nueva Zelanda (EPPO, 2024). Este nemátodo actúa como vector de dos virus que afectan la vid: virus del mosaico del Arabis (Arabis mosaic virus, ArMV) y el virus de la mancha anular de la fresa (Strawberry latent ringspot virus, SLRV). Ambos han sido descritos en Chile, pero sólo el virus del mosaico del Arabis se ha determinado en el cultivo de la vid.

6.3.2. *Longidorus* spp. y *Paralongidorus* spp.

Los géneros *Longidorus* (Figura 6.5 A) y *Paralongidorus* (Figura 6.5 B), también actúan como vectores de virus en la vid, pero en Chile no se han determinado las especies virales que ellos transmiten.

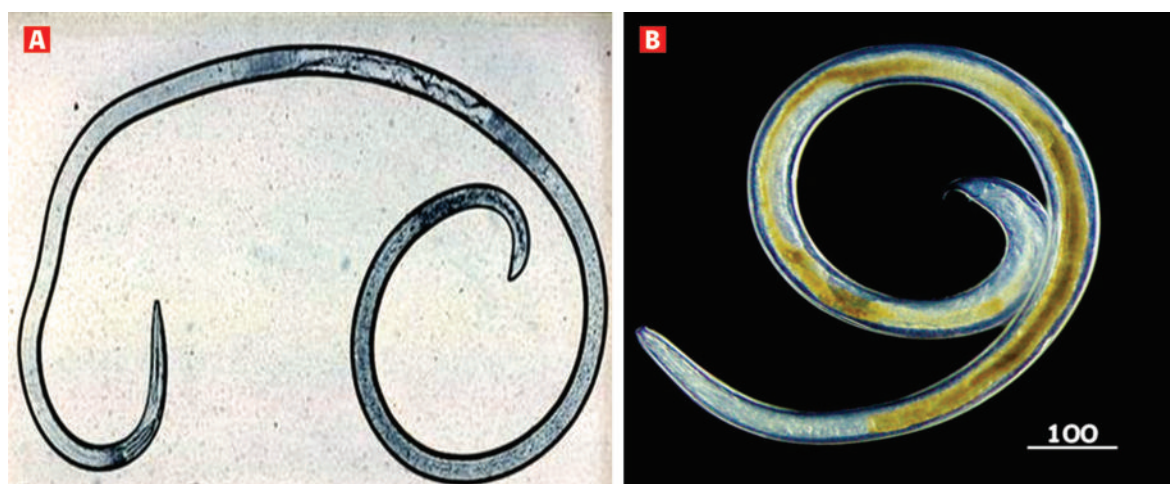


Figura 6.5. A: Morfología de *Longidorus* spp. B: *Paralongidorus* spp.

Longidorus se caracterizan por ser de gran longitud, de 2 a 11 mm, con un estilete de 180 μ m. Presentan un anillo guía rodeando la mitad anterior del odontoestilete. Las especies de este género que transmiten virus generalmente retienen esta habilidad por menos de dos meses, sin embargo, numerosas malezas son hospedantes de estos nemátodos y de los virus, de manera que los virus son fácilmente readquiridos y, por lo tanto, la transmisión al cultivo es continua. En algunos tipos de suelo es común encontrar poblaciones de *Longidorus* sp. hasta 60 - 90 cm de profundidad; su ciclo de vida puede tomar desde varias semanas hasta varios años (Velázquez *et al.*, 2015). En la vid, *Longidorus* transmite seis especies de virus (Andret-Link *et al.*, 2017), de las cuales ninguna está presente en Chile.

En el género *Paralongidorus* se han descrito a nivel mundial 75 especies (Haque y Khan, 2021), las cuales afectan diferentes tipos de cultivos. Los *Paralongidorus* tienen una distribución limitada, y la mayor diversidad se reporta en Asia y África (Mwamula *et al.*, 2020). En vid sólo se reporta una especie que actúa como vector de virus: *Paralongidorus maximus* que actúa como vector de la cepa que infecta la vid del virus de la mancha anular del frambueso (Raspberry ringspot virus, RRSV) (Andret-Link *et al.*, 2017). En Chile existen restricciones cuarentenarias para esta especie de nemátodo (SAG, 2002; SAG 2020). Respecto del virus que transmite, tal como se indicó anteriormente, sólo ha sido identificado en frambuesa.

6.3.3. *Trichodorus* spp

En la naturaleza se han identificado 63 especies asociadas al género *Trichodorus* y 27 especies al género *Paratrichodorus* (Magunacelaya y Dagnino, 1999). *Trichodorus* (Figura 6.6), es un género de distribución cosmopolita, conocido como nemátodos acortadores de raíces, ya que ocasionan reducción del desarrollo de las mismas y, como consecuencia, de las partes aéreas, acompañado de clorosis general de las plantas afectadas (Krausz, 1997).

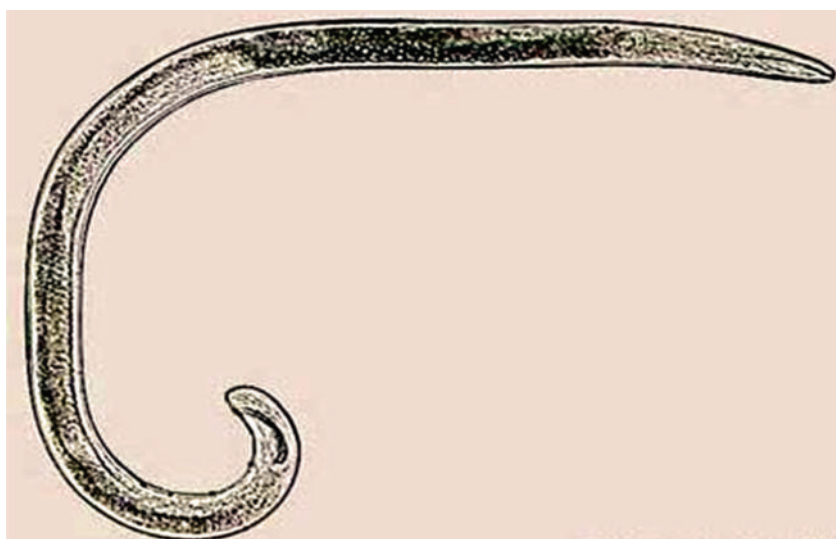


Figura 6.6. Morfología de *Trichodorus* spp.

6.4. Estrategias de manejo de nemátodos en vides

El control de nemátodos fitoparásitos no es fácil, debido a que estos organismos poseen una cutícula poco permeable que les confiere gran resistencia a agentes físicos y químicos de control, y están distribuidos en el suelo a una profundidad variable, dependiendo del largo de las raíces de sus hospederos. Además, poseen una gran capacidad de desarrollo, lo que les permite recuperar rápidamente una población disminuida (González, 2000). La eliminación total de los nemátodos del suelo es casi imposible, por la capacidad de persistencia en ausencia del huésped. Por lo tanto, la mejor estrategia es el uso de manejo integrado, compatibilizando varias medidas que en su conjunto lleven a mantener un nivel de estos patógenos bajo el umbral económico (Martínez *et al.*, 2019).

Las estrategias de control de nemátodos fitoparásitos se basan en medidas preventivas, culturales, biológicas y químicas, cada una con un papel fundamental en la reducción de la incidencia y el impacto de estos organismos en los cultivos.

6.4.1. Manejos preventivos

En primer lugar, las acciones preventivas son esenciales para evitar la infestación inicial de nemátodos en los cultivos. Un programa de monitoreo constante, mediante la toma de muestras de suelo y su análisis en laboratorios especializados, es recomendable para evaluar y controlar la presencia de estos organismos. La observación de síntomas en las partes aéreas de las plantas, como la falta de vigor, el amarillamiento y el debilitamiento, puede ser una señal de su presencia; además, el examen detallado de las raíces es crucial, ya que las deformaciones, engrosamientos o lesiones suelen indicar infestación por nemátodos (Meza, 2019).

Asimismo, se debe garantizar el uso de plantas y material vegetal certificado, libre de virus y nemátodos, y cuando sea posible, optar por variedades resistentes. Además, todos los elementos utilizados en la propagación deben estar libres de estos patógenos. La mantención regular de las herramientas y maquinaria agrícola también es esencial para evitar la diseminación de nemátodos, limpiando cuidadosamente el suelo adherido a las ruedas y superficies para reducir el riesgo de transporte de estos patógenos desde áreas infestadas hacia áreas libres.

También resulta clave controlar la presencia de plantas acompañantes que podrían servir como fuente alternativa de alimento o infección para los nemátodos, evitando así el aumento de su población y la propagación de enfermedades virales (Arias, 1983).

6.4.2. Manejos culturales

Las prácticas culturales desempeñan un rol significativo en la reducción de las poblaciones de nemátodos en el suelo. La rotación de cultivos es una de las prácticas más efectivas, ya que alternar cultivos susceptibles con aquellos que no son hospedantes permite disminuir progresivamente la población en el suelo al reducir su fuente de alimento, sin embargo, para nemátodos transmisores de virus en vides, no es una medida posible.

El uso de enmiendas de suelo, como compost y residuos de cultivos, incrementa la presencia de enemigos naturales de los nemátodos, contribuyendo al control de sus niveles de infestación.

La pasteurización de los medios con calor como el vapor de agua puede controlar los nemátodos en recipientes, camas elevadas e invernaderos (Bethke, J. *et al.*, 2020) que si bien no aplica para vides en terreno, podrían ser prácticas utilizables en viveros de vid; también, hoy existe la alternativa de la aplicación de ozono en agua de riego, cuyo potencial altamente oxidativo, rompe paredes y membranas celulares de los nemátodos, sin dejar residuos tóxicos, siendo inocuo para el suelo, el agua, los cultivos y la salud humana (Villalobos *et al.*, 2016). Al respecto, Prado (2023), al inyectar ozono al suelo para control de *Meloidogyne* spp y *Pratylenchus* spp, observó que, tras una primera aplicación, hubo una reducción significativa de las formas móviles de *Meloidogyne* del orden de 86 % y en *Pratylenchus*, a pesar de tener un efecto más lento, hubo una reducción de 100 %. Lamentablemente, también se produjo una reducción importante de nemátodos saprófagos, en un 71 %. Sin embargo, se pudo establecer que luego de seis días de aplicado el ozono al suelo, las poblaciones de todos los nemátodos se restablecieron.

La solarización en climas cálidos antes de la siembra puede reducir temporalmente las poblaciones de nemátodos en los 30 cm superiores del suelo. La solarización implica cubrir el suelo húmedo y desnudo o la mezcla del recipiente con una o dos capas de plástico transparente durante varias semanas bajo un clima cálido. En algunos casos, la incorporación de modificaciones (como abono) o la aplicación de dosis más bajas de lo normal de plaguicidas fumigantes en combinación con la solarización puede pro-

porcionar un mejor control que el uso de cualquier método por separado. El uso correcto de la técnica solarización “doble carpa” puede erradicar completamente los nemátodos parásitos de las plantas, los patógenos y las semillas de malezas de los contenedores de viveros (Bethke *et al.*, 2020).

El uso de materia orgánica es efectivo para disminuir las poblaciones de estos patógenos, como guano de aves y otros animales, compost, residuos de plantas con propiedades nematicidas, algas o subproductos de la agroindustria ricos en proteínas. El efecto de la liberación de compuestos nematicidas en estas materias orgánicas se debe a la producción de amonio y ácidos grasos durante la fermentación, aumento e introducción de microorganismo antagónicos, incremento de la tolerancia de la planta producto del estímulo de la materia orgánica o cambios en el suelo que no permiten la proliferación de los nemátodos (Martínez *et al.*, 2019). La incorporación de estiércol animal, fertilizantes orgánicos, residuos de cultivos y compost aumenta el contenido de materia orgánica del suelo. Esto mejora la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas, reduce el estrés de las plantas y puede fomentar un mayor número de depredadores de nemátodos y parásitos. También se puede utilizar el calor generado por microorganismos descomponedores durante el compostaje para controlar nemátodos, pero la preparación de abonado libre de patógenos requiere de un manejo cuidadoso y monitoreado.

La biofumigación, basada en la liberación de sustancias volátiles provenientes de la degradación de materia orgánica, también es una herramienta efectiva, aunque su uso está limitado por el costo y la disponibilidad de grandes cantidades de materia orgánica. Una de las mejores enmiendas son los derivados o cultivos de la familia de las brásicas, las que liberan compuestos tipo glucosinolatos que tienen propiedades nematicidas (Fourie *et al.*, 2016).

El uso de extractos de origen natural para el control de nemátodos fitoparásitos ha sido probado en los últimos años, logrando promisorios resultados asociados a sustancias extraídas de papaya, plantas aromáticas y aceites esenciales (Aquea y Krausz, 2023); particularmente, se ha trabajado en la evaluación de diversos extractos vegetales ricos en polifenoles y proteínas, extractos de quillay, aceites naturales de *Melaleuca alternifolia* (árbol del Té) (Guzmán y Valdés, 2019; Labarca y Tejada, 2024); extractos de *Frankenia chilensis* (Hierba del Salitre) (Valdés, 2018); *Lupinus* spp (Ortiz, 2023) y *Tagetes patula* (Baldo, 2024), entre los más destacados, buscando alternativas más inocuas para el control de estos agentes.

6.4.3. Manejo a través de resistencia genética

La elección de cultivares resistentes o el uso de portainjertos resistentes, permite reducir el impacto de los nemátodos de una forma ambientalmente amigable y segura para la salud humana (Lezaun, 2016; Meza, 2019; González, 1993). La resistencia está definida como una característica o un conjunto de características de las plantas que inhiben la reproducción de una o más especies de nemátodos. Un cultivar resistente debe prevenir una gran proporción de la reproducción, generalmente 90 % o más en comparación con los cultivares susceptibles de la misma especie. Las plantas tolerantes tienen características que reducen el daño al desarrollo o rendimientos de una planta infectada por una especie de nemátodo, es decir, existe un considerable incremento en el rendimiento o desarrollo, comparado con cultivares de plantas que carecen de tolerancia o resistencia (Taylor y Sasser, 1983). Las plantas resistentes poseen diversos mecanismos de defensa (fisiológicos y anatómicos) para usar en contra de los patógenos. Los mismos autores agregan que las plantas hospederas tienen varios grados de susceptibilidad. Las más importantes son las altamente y moderadamente susceptibles, en las cuales la reproducción del nemátodo es normal; dentro de las plantas que son menos que moderadamente susceptibles, es decir, resistentes, están las ligeramente, moderadamente y altamente resistentes. En una planta altamente resistente, la reproducción es menor que 2 % de la reproducción en una planta susceptible en similar infestación del suelo, en una planta moderadamente resistente 10 % a 20 %, y en una planta ligeramente resistente hasta el 50 %.

Respecto al uso de portainjertos en vides, en Chile los portainjertos con mayor presencia en términos de superficie plantada son Harmony, Freedom y Ramsey, los tres provenientes de Estados Unidos. Esto se debe a la influencia norteamericana sobre la viticultura chilena, y a la no presencia de problemas de Filoxera (*Phylloxera vastatrix*) y caliza a los cuales se orientaron los procesos de selección europeos. Así, los patrones presentan un comportamiento más adecuado a condiciones como la escasez o exceso de agua y la salinidad o acidez del suelo. Algunos destacan particularmente, como es el caso de Paulsen en tolerancia a sequía, o Ramsey por su capacidad de soportar salinidad. Además, suelen lograr una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, un mayor crecimiento de la raíz y un mejor comportamiento frente a complejos bioantagonistas en el caso de replantes (Ljubetic, 2016).

Además de la importancia de resistir la presencia de nemátodos en las vides, cuando se habla de portainjertos, cobra relevancia la incompatibilidad o rechazo genético entre portainjerto y variedad, ya que la presencia de virosis en las vides, puede comprometer la compatibilidad de ambos. De hecho, en Chile se ha determinado la incompatibilidad de uva de mesa variedad Red Globe con los portainjertos Teleki 5 A, 3309 Couderc, Paulsen 1103 y Kober 5BB por la presencia del virus GFLV (Virus del abanico de la vid) transmitido por *Xiphinema index* (Ljubetic, 2016).

De acuerdo a información extraída de Viveros Richter Chile, que produce plantas injertadas de vides viníferas, pisqueras y de mesa, existen portainjertos que presentan cierta resistencia a nemátodos de los géneros *Meloidogyne* y *Xiphinema*, tal como se muestra en Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1. Ejemplo de portainjertos presentes en Chile con resistencia a nemátodos.

Portainjerto	Familia Vitis	Resistencia a <i>Xiphinema</i> spp	Resistencia a <i>Meloidogyne</i> spp
Harmony	1613C (Solonis x Othello)x Dogridge	Media-Alta	Media-Alta
Freedom	1613C (Solonis x Othello)x Dogridge	Media-Alta	Media-Alta
SaltCreek	Champinii	Alta	Alta
S04	Berlandieri x Riparia	Media	Media-Alta
5BB	Berlandieri x Riparia	Media	Media-Alta
R110	Berlandieri x Rupestris	Baja	Baja- Media
Ru140	Berlandieri x Rupestris	Baja	Baja- Media
Paulsen 1103	Berlandieri x Rupestris	Baja	Media-Alta
3309 C	Riparia x Rupestris	Baja	Baja
101-14	Riparia x Rupestris	Media	Media-Alta

Fuente: Viveros Richter Chile, (2024).

6.4.4. Manejo biológico

Actualmente, el control biológico representa una alternativa sostenible. Para implementar el control biológico, puede realizarse la introducción directa de agentes biológicos en suelos infestados o mejorar la biodiversidad del suelo para fomentar una microbiota equilibrada que incluya enemigos naturales de los nemátodos. La rotación de cultivos y el uso de plantas trampa son también estrategias eficaces, ya que disminuyen las poblaciones de nemátodos y, por ende, la propagación de enfermedades virales en los cultivos (López y Jansson, 2001; Quevedo *et al.*, 2022; France, 2000).

Consiste en el uso de enemigos naturales específicos para las plagas, los cuales son manejados por el hombre, ya sea a través de modificación del ambiente facilitando su predominancia, la

introducción de enemigos naturales y posterior adaptación a las condiciones del medio, o la producción de ellos en condiciones de laboratorio para posterior liberación masiva y periódica al medio ambiente (Hidalgo, et al., 2013).

Dentro del control biológico se utilizan diferentes especies de hongos nematófagos que han sido evaluados con resultados promisorios, como *Paecilomyces lilacinus*, *Plectosphaerella cucumerina* y *Pochonia chlamydosporia*. En general, *P. lilacinus* es considerado como el hongo más efectivo y de mayor uso para control biológico (Martínez et al., 2019).

Hay un grupo de compuestos de origen biológico que corresponde a toxinas o metabolitos derivados de la destilación de las bacterias *Streptomyces fumanus*, *Streptomyces avermitilis* y *Saccharopolyspora spinosa* que tienen efecto insecticida, acaricida y nematicida (Méndez et al., 2009).

Algunos plaguicidas biológicos incluyen ciertas bacterias de las especies *Burkholderia*, *Pseudomonas* y subproductos naturales de *Myrothecium verrucaria* (Bethke et al., 2020).

Son los niveles altos de compost y guano los que estimulan el desarrollo de estos organismos que ayudan a bajar la presión de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos. Todos estos organismos están presentes en el suelo y bajo ciertas condiciones alcanzan un buen desarrollo. Se ha acuñado el término de suelos supresivos, para denominar aquellos suelos donde se han desarrollado algunos de estos microorganismos de manera importante y, a lo largo del tiempo, han sido capaces de disminuir o manejar las poblaciones de nemátodos del suelo.

6.4.5. Manejo químico

Por último, el control químico corresponde al método más utilizado en la actualidad para controlar nemátodos, a través del uso de nematicidas, siendo efectivos pero cuestionados debido a su toxicidad y efectos ambientales. Se recomienda su aplicación únicamente cuando hay una alta infestación de nemátodos, y preferiblemente optar por productos menos tóxicos, como los bionematicidas (Lezaun, 2016; Meza, 2019).

Dentro del control químico se utilizan tradicionalmente grupos químicos organofosforados y carbamatos, pero el problema que tiene este tipo de control es que no hay un 100 % de efectividad, debido a que la cubierta de los huevos y la pared de quistes de nemátodos que los forman, son resistentes al ingreso del nematicida. Además, al aplicar productos químicos se debe tener alternancia y cuidado con la dosis empleada, ya que se produce una descomposición microbiana rápida en el suelo (Krausz, 1997).

Una vez establecida la plaga se puede hacer uso de los nematicidas, pero tienen un alto costo y producen una indeseable contaminación del ambiente, además que no siempre resultan ser efectivos. Sin embargo, se utilizan ampliamente en Europa a través del uso de fumigantes de preplantación, como son el 1,3 Dicloropropano y el Metam sodio (Martínez et al., 2019).

Todos los organismos que entren en contacto con estos plaguicidas se verán afectados, en consecuencia, también los organismos benéficos como los controladores naturales de nemátodos y otras plagas, generando un desequilibrio en las poblaciones de organismos que habitan el suelo y aumentando posteriormente en gran medida los nemátodos sin sus depredadores naturales.

En la actualidad, se han incorporado nuevos grupos químicos que buscan resultados más efectivos en el control de nemátodos, tales como Avermectinas, Piridiniletibenzamidas, Fluoroalquenilsulfonas, Fenetilpiridinamidas, entre otros, más una serie de productos plaguicidas de origen orgánico natural o biológico.

6.5. Bibliografía

- Andret-Link, Marmonier, A., Belval, L., Hleibieh, K., Ritzenthaler, C., and G. Demangeat (2017). Ectoparasitic Nematode Vectors of Grapevine Viruses En Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (pp. 505–529). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_25
- Arias, M. (1983). Nemátodos transmisores de virus de los árboles frutales. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, vol. 9(2), 167–181. Disponible en <https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/bsvp-09-02-167-181.pdf>
- Aquea, A. y Krausz, C. (2023). Control de nematodo dorado de la papa *Globodera rostochiensis* W. con extracto de semilla de papaya (*Carica papaya* L.) en cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Libro resúmenes 30º Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología 2023
- Baldo, I. (2024) Evaluación de aplicación de extracto de clavelón (*Tagetes patula*) sobre la población del nematodo de la frutilla (*Aphelenchoides fragariae*) en ensayo de macetas. Universidad de La Serena. 13p.
- Bethke, J. & Koike, Steven & McKenry, Michael & Ploeg, Antoon & Stapleton, James & Wilen, Cheryl. (2020). UC IPM Pest Management Guidelines Floriculture and Ornamental Nurseries. UC ANR Publication 3392. Oakland, CA
- Decraemer, W y Chaves, E. (2012). Longidoridae and Trichodoridae. En Practical Plant Nematology (pp. 579–617)
- Dropkin, V. (1980). Introduction to plant nematology. John Wiley & Sons, Inc. EE.UU. 293 p.
- EPPO Global Database (EPPO) (2024). *Xiphinema diversicaudatum* (XIPHDI). Consultado el 15 de noviembre de 2024. Disponible en <https://gd.eppo.int/taxon/XIPHDI>
- France, A. (2000). Problemas nematológicos de la vid. En Establecimiento y manejo de vides en el secano interior centro sur de Chile (pp.131–148). <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7263>
- Fourie, H., Ahuja, P., Lammers, J., & Daneel, M. (2015). Brassicacea-based management strategies as an alternative to combat nematode pests: A synopsis. Crop Protection, 80, 21–41. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.10.026>
- González R., Héctor (Jul–Ago 1993). Nemátodos vectores de enfermedades virosas [en línea]. Investigación y Progreso Agropecuario La Platina. (Nº 77) p. 18–21. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/30845>
- González, H. (2000) Nemátodos. En Uva de mesa en Chile (pp. 274–278)
- Guzmán-Piedrahita, O., Castaño-Zapata, J. & Villegas-Estrada, B. (2012). Principales nemátodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Agronomía 20(1): 38 – 50, 2012
- Haque Mujeebur and Rahman Khan. (2021) Longidoridae: Longidorus, Paralongidorus and Xiphinema species. En Handbook of invasive plant-parasitic nematodes (pp.241–277) DOI 10.1079/9781789247367.0009
- Herrera, G. (2000). Virus. En Uva de mesa en Chile. (pp. 289–298)

- Hidalgo A., Daniela, Arribillaga G., Diego y Solís O., Carolina (2013). MIP: Manejo Integrado de Plagas [en línea]. Coyhaique: Informativo INIA Tamel Aike. N° Publicación: no. 4-13. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/4889>
- Krausz, C. (1997). Guía Teórico-Práctica de Fitopatología. Ediciones Universidad de La Serena. 98 p.
- Labarca, S. y Tejada, J. (2024). Efecto de extractos naturales sobre el control de *Meloidogyne* spp en tomate (*Solanum lycopersicum*) en ensayo de maceta. Escuela de Agronomía, Universidad de La Serena. 67 p.
- Lezaun, J. (2016). Nemátodos fitoparásitos: una plaga mundial. CropLife Latin América. Disponible en <https://croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/nemátodos-fitoparasitos>
- López Llorca, L. V., & Jansson, H.-B. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuadernos De Biodiversidad, (6), 12-15. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2001.06.02>
- Ljubetic, D. (2016, julio). Cómo entender mejor los portainjertos en Vides. Redagrícola. Recuperado 10 de noviembre de 2024, de <https://redagricola.com/entender-mejor-los-portainjertos-vides/>
- Magunacelaya R., Juan Carlos, Dagnino D., Elena (Oct 1999). Nematología agrícola en Chile [en línea]. Santiago: Serie Ciencias Agronómicas - Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. N° 2. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/33765>
- Magunacelaya, J.C., Ahumada, M y Pacheco, H. (2004). Aspectos generales de manejo de nemátodos fitoparásitos de importancia agrícola en viñedos en Chile. <https://www.uvademesa.cl/nemátodos%20avance%20%20JCM20julio04.pdf>
- Martínez A., Carolla y France I., Andrés. (2019). El nematodo quiste de la papa, una plaga cuarentenaria presente en Magallanes. En Antecedentes para la producción de papa en Magallanes. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. N° 396 (pp.211-222) (Consultado: 25 de noviembre 2024)
- Méndez, P. & Inostroza, J. (2009) Manual de papa para La Araucanía. Manejo de cultivo, enfermedades y almacenaje [en línea]. Temuco: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. N° 194. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7299> (Consultado: 27 de noviembre 2024)
- Meza D., Pablo (2019). Nemátodos fitoparásitarios de importancia agrícola enemigos a considerar en el cultivo del ajo [en línea]. Rengo: Informativo INIA Rayentué. no. 70. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4983> (Consultado: 9 de diciembre de 2024)
- Mwamula, A. O., Decraemer, W., Kim, Y. H., Ko, H., Na, H., Kim, Y. H., & Lee, D. W. (2019). Description of a new needle nematode, *Paralongidorus koreanensis* n. sp., and two known *Xiphinema* spp. Cobb, 1913, from turfgrass in Korea. European Journal Of Plant Pathology, 156(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01846-4>
- Ortiz, M. (2023). Evaluación de lupino amargo (*Lupinus* spp) en el control de nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). Escuela de Agronomía, Universidad de La Serena. 12 p.
- Peña, R. y Páez, J. (2014). Fitopatología. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Disponible en: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/NEMÁTODOS.pdf>

- Prado, A. (2023). Evaluación de la efectividad del uso de ozono en el control de nemátodos en el suelo. Escuela de Agronomía, Universidad de La Serena. 9 p.
- Quevedo, Adela, Magdama, Freddy, Castro, Jessenia, & Vera-Morales, Marcos. (2022). Interacciones ecológicas de los hongos nematófagos y su potencial uso en cultivos tropicales. *Scientia Agropecuaria*, 13(1), 97-108. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.009>
- Sepúlveda, R. (2003). Efecto de la incorporación de material vegetal sobre la población de *Xiphinema index* en estacas enraizadas de vid (*Vitis vinifera* var. Thompson seedless) en bolsas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/101722>
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2002). Resolución 3418 EXENTA. Dispone requisitos de internación para estructuras subterráneas de reproducción vegetativa de especies ornamentales y deroga resoluciones que indica
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2020). Resolución 3179 EXENTA, Modifica las resoluciones que indica, en el sentido de eliminar las plagas *Thaumastocoris peregrinus* y *Uromyces transversalis* presentes en el país
- Taylor, A. y Sasser, J. (1983). Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. North Carolina State University Press, 1987, 111p.
- Valdés, María Constanza. (2018). Efecto alelopático de *Frankenia chilensis* Prel sobre quistes de nematodo dorado de la papa (*Globodera rostochiensis* Mill) en ensayo de maceta volteada de papa (*Solanum tuberosum* L.). Universidad de La Serena. 71 p.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R., Salas-Muñoz, S. y Mauricio-Castillo, J.A. (2015) Distribución de vectores y virus en frutales de hueso en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto Técnico Número 67. Campo Experimental Zactecas. CIRNOC-INIFAP. 30 pág. Disponible en: <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/vectoresVirusHueso.pdf>
- Villalobos, C.; Serrano, F. y Morales, J. (2016). Efecto del ozono sobre la población microbiana del suelo y el crecimiento de plantas de fresa. *Revista Terra Latinoamericana*. 34(2):229-237

Saneamiento: una metodología para el control de enfermedades causadas por virus en la vid

Capítulo

7



Capítulo 7

Saneamiento: una metodología para el control de enfermedades causadas por virus en la vid

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.

Karina Sepúlveda G.

Ingeniera Agrícola

Isabel Ramírez A.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

De acuerdo con lo presentado en capítulos anteriores, el efecto de algunos virus en el cultivo de la vid tiene importantes implicancias económicas. Lamentablemente, el control de las enfermedades virales no es fácil, ya que no existe un control químico. Por ello, las estrategias de manejo se basan en la prevención, mediante actividades como el establecimiento de viñedos con plantas libres de virus y estrategias culturales en el manejo del cultivo.

La prevención de la diseminación de estas enfermedades debe comenzar en los viveros, donde ocurre la producción masiva de plantas, que utiliza como base una planta madre desde la cual se obtiene el material de propagación. La ausencia de virus en las plantas madres es esencial para obtener un mejor prendimiento de los injertos y desarrollo de las nuevas plantas. La calidad sanitaria de las plantas madres constituye un punto crucial en la producción, ya que posteriormente repercutirá en el viñedo establecido, determinando el comportamiento productivo de éste y su vida útil.

7.1. Control de enfermedades causadas por virus

La mantención de plantas madres libres de virus es un trabajo arduo, que requiere constancia y una constante vigilancia para prevenir la aparición de vectores de virus que puedan infectarlas. Es por esto que el control químico de los vectores, así como el constante monitoreo mediante análisis virológicos realizados en laboratorio, son vitales para conservar la condición de libre de virus de estas plantas. Por estas razones, el sistema de mantención de plantas madres libres de virus se vuelve costoso, pues además requiere personal especializado o de dedicación exclusiva al funcionamiento óptimo del sistema.

En teoría, cada centro de producción de plantas o vivero podría definir sus parámetros de calidad respecto de qué enfermedades controlar, sin embargo, esto no permitiría tener una mirada sanitaria global, que es lo que realmente se requiere para robustecer la industria de la producción de plantas y frutas. Por ello, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) tiene disponibles normativas para el control de enfermedades causadas por virus en la vid, como es un sistema de certificación (Resolución 7.605 de 2013) que permite asegurar la calidad sanitaria de las plantas producidas, con un listado de los siguientes virus: Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll associated virus-1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll

associated virus-2 (GLRaV-2), Grapevine leafroll associated virus-3 (GLRVaV-3), Grapevine virus A (GVA) y Grapevine virus B (GVB). La suscripción de un vivero al sistema de certificación es voluntaria. Considerando que hay ciertas infecciones virales que causan grave impacto en el rubro, el SAG también ha generado otra normativa para el control de ellas, denominada Plagas No Cuarentenarias Reglamentadas (PNCR). Existen dos diferencias sustanciales entre la certificación y la PNCR, y es que esta última es obligatoria y sólo considera dos virus GFLV y GLRaV-3. Los detalles de la norma están establecidos en la Resolución del SAG N° 4.145 del año 2021.

7.2. Técnicas de laboratorio para saneamiento

Los virus están ampliamente distribuidos en el cultivo de la vid, dificultando el poder encontrar material sano para establecer un plantel de plantas libre de virus. La biotecnología dispone de herramientas que permiten sanear el material vegetal infectado. El proceso de saneamiento es muy útil para generar material élite, sin embargo, no es práctico utilizarlo masivamente, ya que es lento y costoso. Esta metodología es aplicada en muchos países y en diversos cultivos, en centros de saneamiento de renombre como el National Clean Plant Network (NCPN) en Estados Unidos, cuyo objetivo es proteger a los cultivos económicamente importantes frente a la propagación de plagas y enfermedades, y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en la ciudad de Córdoba, Argentina, que se ha especializado en el saneamiento del ajo, cultivo de importancia económica en dicho país.

Existen diversas metodologías, que combinadas o por sí solas, permiten lograr el saneamiento de un individuo. La elección de la mejor técnica dependerá del tipo de virus, la especie vegetal, los recursos disponibles y la experiencia del personal, siendo las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* las más efectivas (Smith *et al.*, 2017). Un enfoque integral que combine diferentes técnicas puede ser la mejor estrategia para lograr el saneamiento exitoso de las plantas. A continuación, se mencionan aquellas metodologías conocidas más ampliamente y que están disponibles para su utilización en laboratorios.

7.2.1. Termoterapia

La termoterapia es la técnica más antigua que ha sido utilizada para la eliminación de virus (Varveri *et al.*, 2015). Se basa en la exposición de las plantas a temperaturas elevadas (entre 37 °C y 42 °C) durante un período determinado que le permite a la planta sobrevivir y al mismo tiempo inactivar las partículas virales presentes (Wang *et al.*, 2018). Este es un balance muy delicado que se debe evaluar correctamente, puesto que las altas temperaturas causan un gran estrés en las plantas, el cual se intensifica a medida que la duración del tratamiento aumenta (Wahid *et al.*, 2007), disminuyendo las tasas de sobrevivencia de los explantes. Una forma de amortiguar el daño producido por la repentina alza de temperatura, es pre-acondicionando las plantas a tratar, es decir, ir aumentando paulatinamente la temperatura a la que están expuestas, permitiendo que se adapten a las condiciones térmicas. Esta metodología se aplicó inicialmente a plantas adultas de duraznero mantenidas en macetas, siendo Kundel quien la utilizó por primera vez en el año 1936 (Kunkel, 1936). Sin embargo, en la actualidad el pre-acondicionamiento se utiliza mayormente en condiciones *in vitro*, lo que permite aumentar el número de individuos en un espacio reducido.

Para vides, la efectividad del tratamiento depende tanto del cultivar de vid a sanear como del tipo de virus a erradicar (Maliogka *et al.*, 2009). Por ejemplo, Panattoni y Triolo (2010) mostraron que GFLV fue el más sencillo de eliminar, mientras que GFkV fue completamente insensible a la termoterapia.

Los mecanismos por los cuales la termoterapia es efectiva en mejorar la erradicación de virus no se conocen en detalle aún. Se cree que ocurrirían rupturas de los puentes de hidrógeno y disulfuro de la proteína de la cápside viral, como también de las uniones covalentes de los ácidos nucleicos (Panattoni *et al.*, 2013). Además podría afectar el movimiento de las partículas virales hacia el meristema, así como las altas temperaturas promoverían la respuesta de silenciamiento de ARN inducido por virus (Liu *et al.*, 2016).

La termoterapia es una técnica relativamente simple y económica, pero por sí sola no es muy eficaz y puede dañar las plantas si no se aplica correctamente. Sin embargo, ofrece muy buenos resultados al ser combinada con otras estrategias de saneamiento.

7.2.2. Cultivo de meristemas

Es una de las técnicas más utilizadas que se basa en el hecho de que gran parte de los virus no pueden entrar en el meristema de una planta (Mochizuki y Ohki, 2015), debido a que los tejidos vasculares diferenciados se encuentran alejados de los meristemas y los elementos vasculares de los primordios foliares son incipientes. Por esta razón, esta técnica por sí sola es muy efectiva en virus restringidos a tejidos vasculares, dado que éstos rara vez se encuentran en tejidos indiferenciados ya que para llegar a la zona meristemática sólo lo pueden hacer moviéndose lentamente célula a célula (Grout, 1999).

El meristema (0,2 - 0,4 mm) debe ser extirpado en condiciones estériles y colocado en un medio de cultivo adecuado para condiciones *in vitro*, para finalmente regenerar una planta libre de virus. Un punto crítico de este método es el tamaño del meristema extraído, ya que mientras más pequeño es el trozo extirpado mayores son las probabilidades de encontrarse con tejido libre de virus, sin embargo, al mismo tiempo, mientras mayor es el tamaño mayor es la posibilidad de que el explante sobreviva y genere una nueva planta en menor tiempo (Faccioli, 2001).

El cultivo de meristemas es una técnica muy efectiva, pero que requiere de personal altamente calificado y laboratorios especializados.

7.2.3. Cultivo de ápices caulinares

El cultivo de ápices meristemáticos consiste en la regeneración de una planta a partir de un explante, el cual incluye el meristemo y uno a tres pares de primordios foliares. La presencia de estos primordios aumenta la tasa supervivencia de estos ápices en comparación a la de un meristemo. No obstante, la eficiencia en la generación de plantas libres de virus es menor que cuando se cultiva sólo el meristemo.

7.2.4. Quimioterapia

Esta técnica implica el uso de agentes químicos en el medio de cultivo de plántulas con el fin de inhibir la replicación de virus. El antiviral más comúnmente usado es ribavirina, un análogo sintético de guanósina, con una actividad de amplio espectro contra virus de ARN y ADN (Leyssen *et al.*, 2005). En general las plántulas se colocan en un medio de cultivo que contenga el antiviral por al menos 30 días, para después recuperarse en un medio de cultivo sin este agente.

La principal desventaja de la quimioterapia es el efecto fitotóxico que se produce en las plantas *in vitro*, el cual se refleja en la baja en las tasas de regeneración y supervivencia, la inhibición de la brotación, la hiperhidricidad, necrosis, clorosis y enanismo (Magyar-Tábori *et al.*, 2021).

7.2.5. Crioterapia

La crioterapia consiste en exponer los ápices caulinares a nitrógeno líquido (-196°C) durante un período de tiempo corto, luego descongelarlas y regenerar el tejido. Es una aproximación diferente al cultivo de meristemas, en donde en vez de extirpar el meristemo se utilizan temperaturas de congelación para matar células distintas a las meristemáticas. Esto ocurre debido a que las células del meristemo son más pequeñas, altamente citoplasmáticas, con pocas vacuolas y menos agua en comparación con otras células, lo cual les permite sobrevivir a temperaturas ultra bajas, mientras que las células diferenciadas y vacuoladas son eliminadas por la formación de cristales de hielo (Wang *et al.*, 2022).

Previo a la exposición al nitrógeno líquido, el tejido vegetal debe ser pre-acondicionado, eliminando parte del agua intracelular; esto puede ser logrado mediante vitrificación (Matsumoto y Sakai, 2000), encapsulación-vitrificación (Benelli *et al.*, 2003), encapsulación-deshidratación (AlMousa y Hassan, 2021) o vitrificación de gotas (Pathirana *et al.*, 2015). Después de la exposición al nitrógeno líquido, el material vegetal se recupera mediante cultivo *in vitro*, cuyas condiciones deben ser óptimas para una buena regeneración de las plántulas.

En general, es una técnica más difícil que requiere de personal e instalaciones especializadas, pero tiene la ventaja de que se descarta el factor del tamaño del explante, pues independiente de su tamaño, sólo sobreviven las células meristemáticas al congelamiento, eliminando automáticamente las posibles células infectadas con virus.

7.2.6. Electroterapia

Esta técnica, relativamente rápida y simple, consiste en la aplicación de una corriente eléctrica continua al tejido vegetal, previo a su establecimiento *in vitro*. La intensidad de la corriente puede variar entre 5 a 100 miliamperes (mA) durante unos 5 a 20 min (Adil *et al.*, 2022). La corriente eléctrica produciría la disrupción o degradación de las nucleoproteínas virales y la eliminación de su actividad virulenta (González *et al.*, 2006).

7.2.7. Embriogénesis somática

Con esta técnica los ovarios o anteras son inducidas a la producción de callos, para luego ser inducidos a formar embriones, los que son cultivados para regenerar una plántula. Es una técnica compleja y lenta, con un alto riesgo de variación somaclonal (Golino *et al.*, 2017).

7.3. Eficiencia del proceso de saneamiento de virus en plantas de vid

De acuerdo a la experiencia del Laboratorio de Virología de INIA La Platina, hay cuatro importantes factores que están involucrados en el éxito y eficiencia del proceso de saneamiento: tipo de virus, genotipo del hospedero, tamaño del explante y técnica utilizada. Por lo tanto, cada especie vegetal, y muchas veces cada variedad, requiere de la estandarización de un protocolo de saneamiento diferente. Al diseñar un protocolo se debe tener en cuenta la eficiencia del proceso, considerando la capacidad para el saneamiento de todos los virus, la dificultad de eliminación de cada uno, el tiempo que requiere cada técnica y los porcentajes de sobrevivencia de los explantes en cada etapa del proceso.

En este capítulo se han descrito siete metodologías que pueden ser utilizadas para el saneamiento de plantas infectadas con virus, cada una de ellas con diferentes niveles de éxito, dificultades de aplicación y riesgos de mutaciones somaclonales. Cada laboratorio o centro de saneamiento utiliza la metodología que más se adecua a sus capacidades, teniendo en común que la clave del éxito está en la combinación de técnicas. Por supuesto, esta combinación debe resultar en un proceso eficiente, es decir, generar individuos libres de virus al menor costo y tiempo posible.

En base a esta premisa, el Laboratorio de Virología de INIA La Platina ha generado un protocolo (Figura 7.1), el cual combina el cultivo de meristemos, termoterapia y cultivo de ápices caulinares.

La termoterapia, por sí sola, es la metodología menos eficiente para generar plantas libres de virus, no obstante, sí reduce considerablemente el título viral en los brotes correspondientes al crecimiento que se genera durante la terapia de calor, por lo tanto, se transforma en una muy buena alternativa cuando se combina con el cultivo de meristemos. La literatura reporta que la termoterapia mantenida durante siete semanas a 40 °C durante el día y 30 °C durante la noche, eliminó a GFLV entre 70 % a 90 % de las plantas tratadas, dependiendo del cultivar, mientras que el cultivo de meristemos eliminó el mismo virus en el 80 % de las plantas tratadas. No obstante, el resultado más eficiente se consiguió al combinar ambas terapias, obteniendo un 100 % de plantas libres de GFLV (Salami *et al.*, 2009).

Golino *et al.* (2017), consideran que meristemos acompañados de tres primordios foliares, es decir, ápices caulinares que son explantes de entre 0,4 a 0,5 mm, es un método eficiente, pues los explantes se regeneran rápido, pero destaca la dificultad de eliminar GRSPaV.

De acuerdo a la experiencia del laboratorio de virología, los virus más prevalentes en las plantas de vid a sanear son: GFLV, GLRaV-1, GVA y GRSPaV. El saneamiento de las tres primeras especies virales se logra con una eficiencia del 53 % al combinar termoterapia y cultivo de meristemos, pero cuando GRSPaV está presente esta eficiencia baja a un 31 %. Con el fin de llegar a un proceso que asegure la obtención de plantas libres de este virus, se estableció un protocolo que involucra una segunda termoterapia seguida de un cultivo de ápices caulinares, lo que permite obtener plantas libres de GRSPaV con un 40 % de eficiencia.

7.4. Descripción de un protocolo de saneamiento para vides

El saneamiento inicia con el diagnóstico del estado sanitario del individuo que se desea liberar de virus. Este diagnóstico se realiza mediante la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuyos resultados normalmente indican que las plantas presentan mezclas de infecciones con distintos virus. Cada virus tiene un diferente grado de dificultad para ser eliminado de la planta. Los individuos infectados con algún virus causante del enrollamiento de la hoja de la vid (Grapevine leafroll associated virus-1,2,3,4,7 y 9), con Grapevine fleck virus (GFKV), Grapevine fanleaf virus (GFLV) y Arabis mosaic virus (ArMV) se sanearán fácilmente utilizando la técnica de termoterapia seguida de cultivo de meristemo. De esta forma se asegura la obtención de una cantidad adecuada de plantas libres de estos virus que satisfaga las necesidades requeridas.

Por otro lado, si el individuo está infectado con un vitivirus (GVA o GVB) o un foveavirus (GRSPaV), el proceso será más complicado y requerirá de más tiempo, especialmente para liberar el material vegetal de GRSPaV, el cual es considerado como recalcitrante debido a la dificultad que significa eliminarlo. En este caso, después de terminada la primera termoterapia, inmediatamente se extrae una microestaca

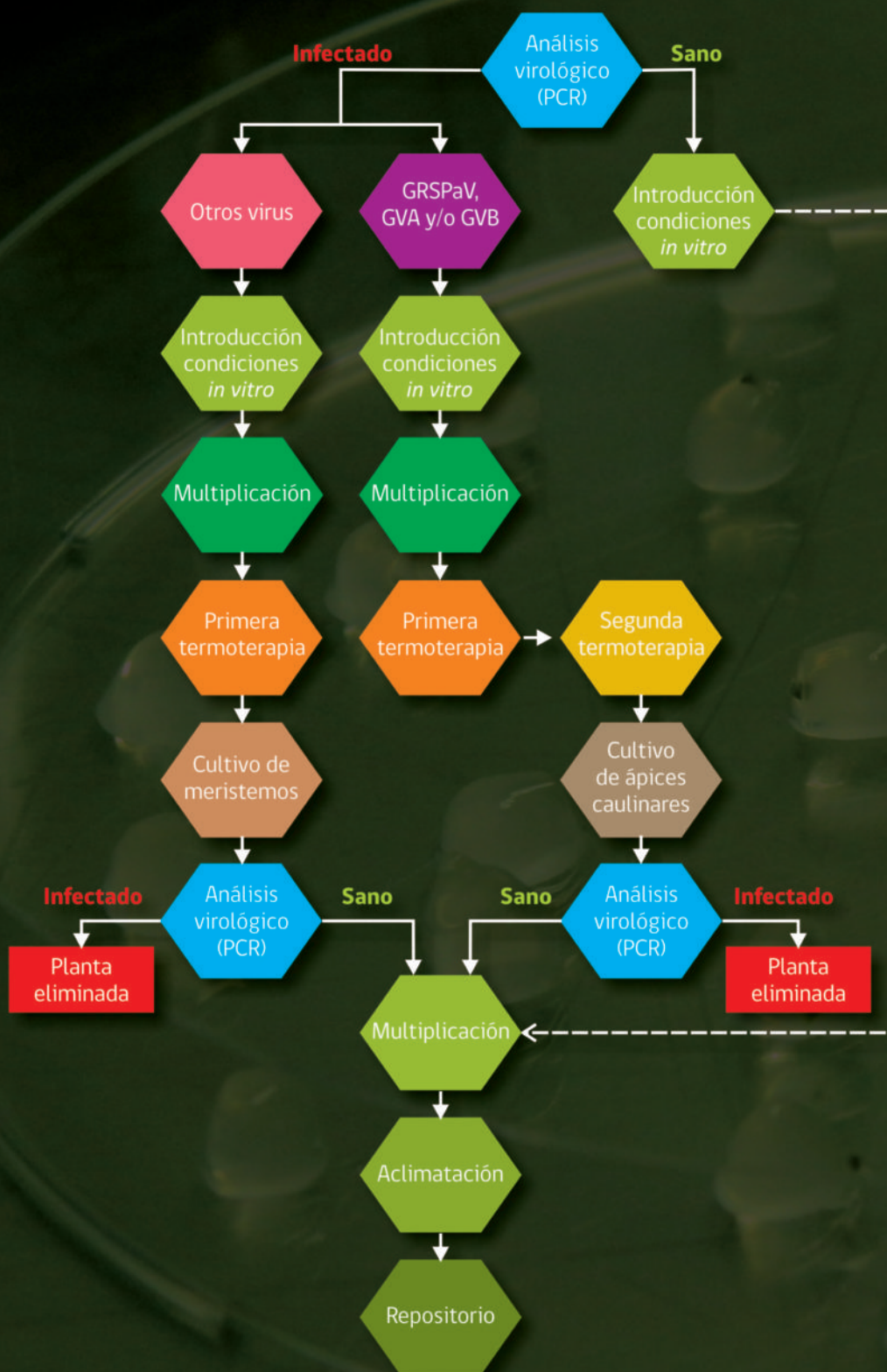


Figura 7.1. Diagrama de flujo del proceso de saneamiento de plantas de vid infectadas con virus.

con una yema desde el ápice de la plántula y se somete a una segunda termoterapia. El proceso de saneamiento finaliza con un cultivo de ápices caulinares. De esta forma se asegura la obtención de al menos una planta libre de estos virus.

A continuación, se especifican cada uno de los pasos del protocolo de saneamiento (Figura 7.1). El detalle del diagnóstico mediante PCR se explica en el Capítulo 4.

7.4.1. Cultivo *in vitro*

Para iniciar el proceso de saneamiento se debe considerar el número de estacas a introducir a condiciones *in vitro*, ya que este proceso tiene un éxito de establecimiento del 50 %. Para realizar la introducción de explantes procedentes de las plantas infectadas a condiciones *in vitro*, lo primero que se requiere es una desinfección del material vegetal. Para esto, las estacas de vid se cortan en trozos de aproximadamente 2 cm y se someten a una primera etapa de limpieza en que son escobillados suavemente utilizando detergente convencional, con el fin de eliminar material en degradación, insectos y polvo. Luego, los trozos de estacas se colocan en un vaso precipitado con detergente en agitación por 10 min. Después de un enjuague con abundante agua, las estacas se sumergen en una solución de sulfato de cobre al 24 % (fungicida y bactericida) a una concentración de 3 ml/L, se dejan con agitación durante 20 min y se enjuagan con agua corriente.

Finalizada esta primera etapa de limpieza se inicia una segunda etapa de desinfección más profunda, llevada a cabo en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. En primer lugar, las estacas se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20 %, preparado con agua destilada estéril, durante 20 min con agitación ocasional. Transcurrido este tiempo las estacas son enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. El exceso de agua se elimina utilizando papel absorbente estéril. Una vez completado este proceso, el material se encuentra listo para procesar e ingresar a condiciones *in vitro* como estacas con una yema, las cuales se mantienen durante cuatro semanas en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 1 °C, bajo un fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Al finalizar este periodo cada estaca se habrá desarrollado como una plántula *in vitro*, la cual se puede multiplicar.

7.4.2. Multiplicación

El proceso de multiplicación, al igual que el de introducción a condiciones *in vitro*, se lleva a cabo en esterilidad utilizando una cámara de flujo laminar. Cada plántula es cortada de un tamaño que considere entre una a dos yemas, siendo cada uno de estos nuevos explantes establecidos en un medio de cultivo leñoso (WPM) que contiene vitaminas, sacarosa 1,5 %, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) 225 mg/L, ácido indolbutírico (IBA) 352 mg/L, agar 0,7 % y carbón activado 0,3 g/L, renovando cada cuatro semanas. Las condiciones de incubación son 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

A partir de una planta *in vitro* desarrollada se pueden obtener en promedio cuatro clones en cada ciclo de replicación, con un máximo de cuatro ciclos, para evitar mutaciones somaclonales. Considerando el máximo de ciclos, este proceso se repite hasta tener alrededor de 50 individuos, los que representan un número adecuado para ingresar a termoterapia (Figura 7.2).

7.4.3. Termoterapia

Las plántulas infectadas que fueron introducidas a condiciones *in vitro* y luego multiplicadas, son cortadas a una altura aproximada de 2 cm, dejando una yema y dos hojas desarrolladas.

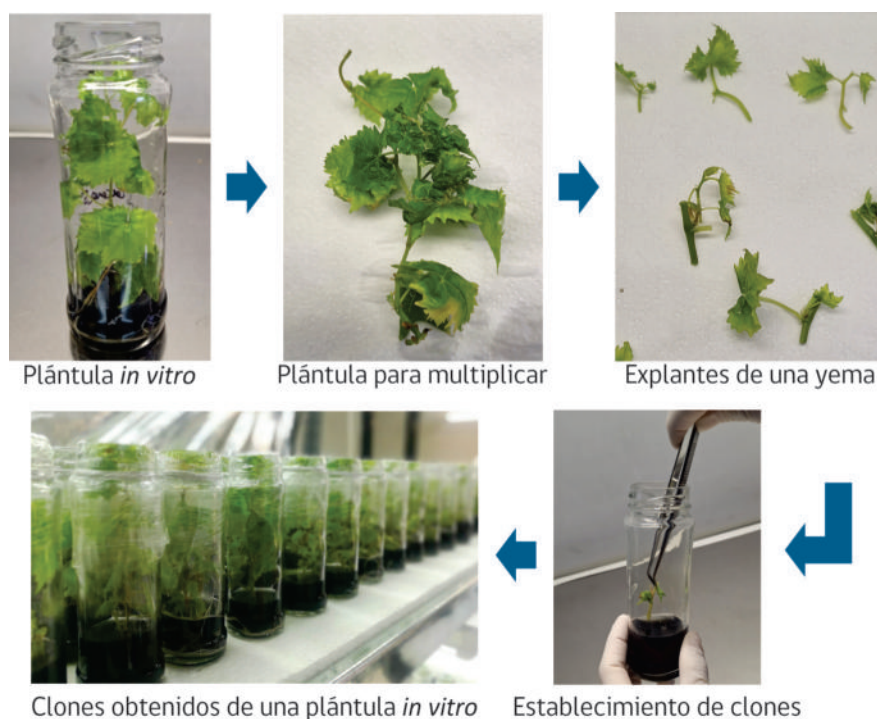


Figura 7.2. Esquema de multiplicación de plantas *in vitro*.

Los explantes obtenidos del corte se siembran en un medio fresco idéntico al utilizado en la etapa de multiplicación. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocan 3 ml de agua estéril sobre el medio de cultivo, manteniendo la precaución de no mojar las hojas del explante. Posteriormente se marca el frasco de cultivo con la altura máxima del explante, con el fin de conocer con exactitud cuál es el tejido que corresponde al crecimiento ocurrido durante la termoterapia. Las plántulas se incuban en una cámara de crecimiento durante dos meses a 37 °C, 70 % de humedad y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Durante este periodo se debe mantener el volumen de 3 ml de agua estéril sobre el medio de cultivo, por lo tanto, periódicamente se revisa cada frasco y se rellena hasta el mismo volumen en el caso que haya disminuido.

Al finalizar la termoterapia, la plántula en saneamiento toma dos caminos diferentes dependiendo de la infección inicial que se haya detectado mediante PCR (Figura 7.1):

- Si los virus presentes son alguno de los causantes de las siguientes enfermedades: enrollamiento de la hoja de la vid (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3), jaspeado de la vid (GFKV) o degeneración infecciosa de la vid (GFLV ó ArMV), se realiza un cultivo de meristemos desde el tejido nuevo crecido durante la termoterapia. Al regenerar el meristemo se espera obtener a lo menos una planta libre de estos virus (Figura 7.1 y 7.3).
- Si en la infección inicial estaba presente GRSPaV, GVA o GVB, el camino que toma el explante es diferente (Figura 7.1). Desde el tejido nuevo crecido durante la termoterapia, se corta una estaca apical de aproximadamente 2 cm que contiene una yema. Esta estaca se siembra en un medio fresco de multiplicación e inmediatamente se introduce por dos meses a condiciones de termoterapia, pero esta vez a 35 °C. Transcurrido este tiempo, a partir de la última yema apical, se debe extraer el ápice caulinar, el cual corresponde a un meristemo con sus 4 primordios foliares. Este tejido es cultivado en un medio MS con vitaminas 4,4 g/L, sacarosa 3 %, 6-BAP 1 mg/L, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad y temperatura de 25 °C (Figura 7.4).



Figura 7.3. Esquema que representa el proceso de termoterapia, el que se inicia con una plántula *in vitro* infectada y finaliza con un análisis virológico.

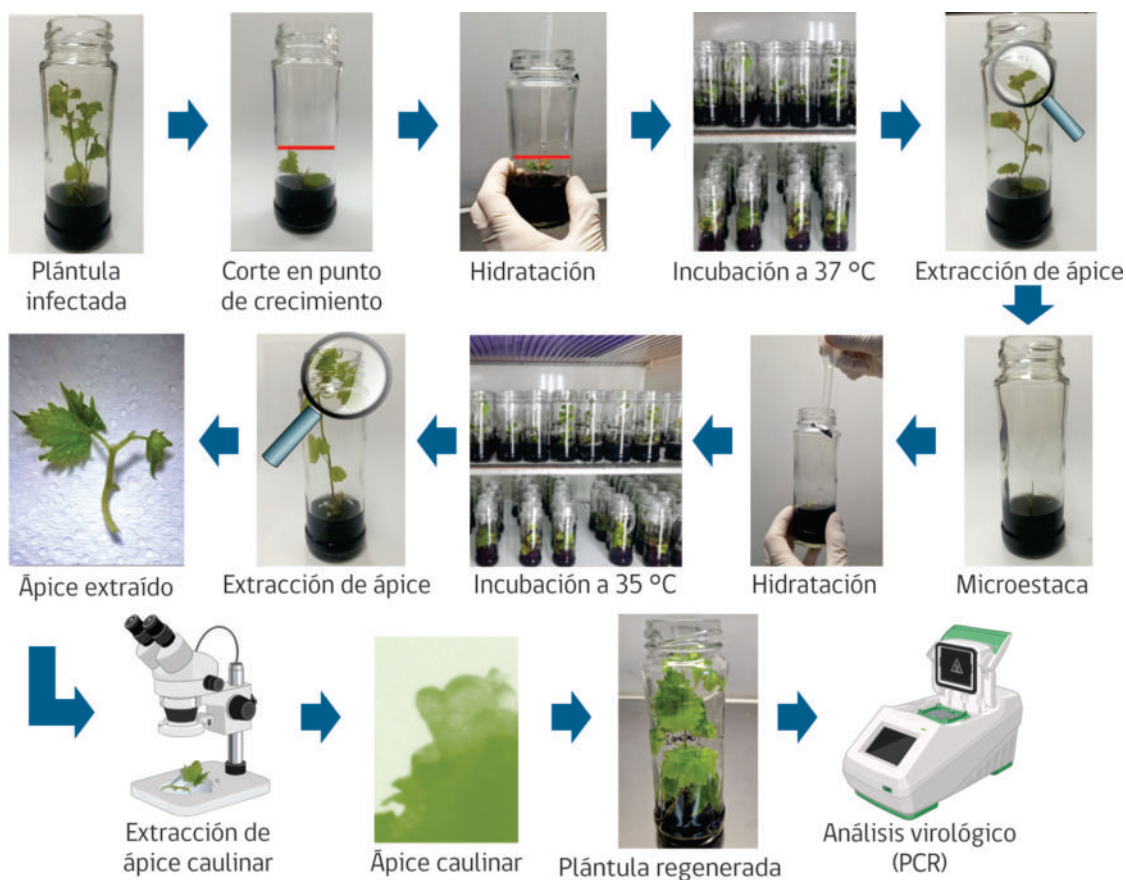


Figura 7.4. Esquema que representa el proceso de dos termoterapias consecutivas, el que inicia con una plántula *in vitro* infectada y finaliza con un análisis virológico.

7.4.4. Cultivo de meristemo y de ápices caulinares

La extracción del meristemo o de un ápice caulinar, que corresponde al domo meristemático con un par de primordios foliares, requiere de la experticia por parte del operador. Desde la yema apical de una plántula que pasó por el proceso de una o dos termoterapias, se procede a eliminar cuidadosamente las primeras capas de hojas que protegen al meristemo, lo cual se realiza con la ayuda de una lupa estereoscópica con aumento de 50X, pinzas y bisturí estériles. Una vez extraídas las primeras capas, se identifican los primordios foliares.

Si el cultivo será de ápices caulinares se procede a extraer un explante de entre 0,4 a 0,5 mm que contiene el domo meristemático más dos pares de primordios foliares. Por otro lado, si el cultivo que se realizará será de meristemos, se procede a eliminar cuidadosamente los primordios foliares, para no dañar el tejido meristemático. Se extrae el domo meristemático con la ayuda del bisturí, estableciéndolo inmediatamente en medio de cultivo compuesto por MS con vitaminas 4,4 g/L, sacarosa 3 % y 6-BAP 1 mg/L. Esta etapa debe ser rápida y precisa para evitar la deshidratación y pérdida de turgencia del tejido meristemático. El cultivo se realiza en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 1 °C durante 4 semanas, bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Figura 7.5).

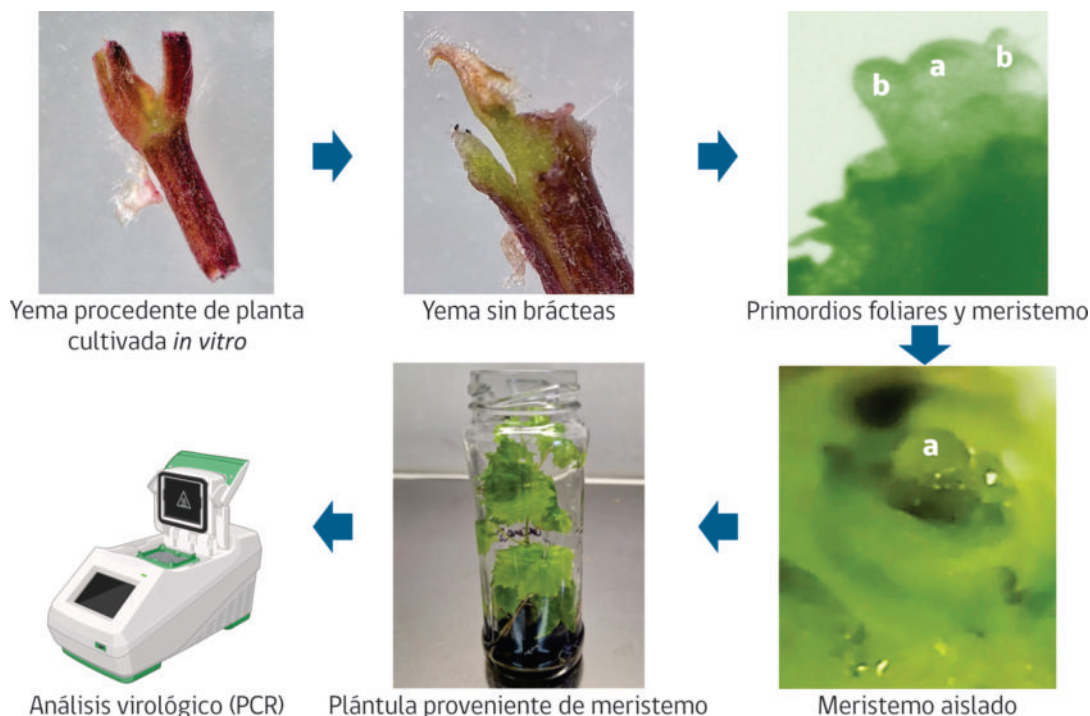


Figura 7.5. Esquema del proceso de cultivo de meristemo, el que inicia con una yema apical procedente de una planta infectada y termina con un análisis virológico. En la figura, los primordios foliares se señalan con la letra b y el meristemo con la letra a.

Entre las cuatro a seis semanas, los meristemos o ápices caulinares muestran regeneración y una elongación de aproximadamente 2 cm, momento en que se procede a cambiarlos a un segundo medio de cultivo con hormonas que favorecen el enraizamiento. Este medio está compuesto por MS con vitaminas, sacarosa 1,5 % e IAA 1 mg/L. Los meristemos elongados se mantienen en este medio durante tres semanas bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que en la etapa anterior. Al finalizar este periodo, aquellos meristemos elongados que desarrollaron raíz son transferidos a un tercer medio de cultivo, el cual favorecerá el desarrollo de una plántula. Este medio está compuesto por WPM con

vitaminas, sacarosa 1,5 %, 6-BAP 1 mg/L, IBA 1 mg/L, agar 0,7 % y carbón activado 3 g/L. Cuando la plántula alcanza una altura de aproximadamente 5 cm se realiza un análisis PCR y se determina su nueva condición sanitaria (Figura 7.5).

Las plántulas que después de pasar por este proceso aún presentan infección con algún virus son eliminadas, mientras que aquellas con la condición “libre de virus” pasan a ser multiplicadas *in vitro* y finalmente aclimatadas en invernadero.

7.4.5. Aclimatación de plántulas

Las plántulas de vid libres de virus que alcanzan una elongación de aproximadamente 5 cm con hojas y raíces bien desarrolladas son sometidas a un proceso que recibe el nombre de aclimatación.

La aclimatación se realiza en invernadero a 25 °C con el fotoperiodo natural que corresponde a la época del año. La vid se puede aclimatar en cualquier temporada. Para la aclimatación se utilizan bolsas de 300 ml, que contienen un sustrato estéril conformado por turba y perlita en relación 2:1. El proceso consiste en extraer las plántulas de los frascos de cultivo *in vitro*, lavar bien las raíces para eliminar completamente los restos de agar y establecerlas en las bolsas previamente preparadas con el sustrato estéril. Las plántulas deben ser cubiertas inmediatamente de forma completa con un envase plástico transparente, imitando las condiciones *in vitro* que las aíslan del medio ambiente. Toda esta etapa debe realizarse rápidamente para evitar la deshidratación de las plántulas.

En estas condiciones, las plántulas se mantienen durante una semana. Cumplido este plazo, se inicia la aclimatación gradual de la planta a la humedad ambiental del invernadero, lo cual se logra realizando una pequeña perforación al envase que cubre la plántula. Esto se realiza semanalmente, de tal modo que en un plazo de cinco semanas la planta queda totalmente descubierta. Es mantenida de esa forma en el invernadero hasta cumplir por lo menos tres meses (Figura 7.6). Las pérdidas de plántulas en esta etapa no sobrepasan el 10 %.

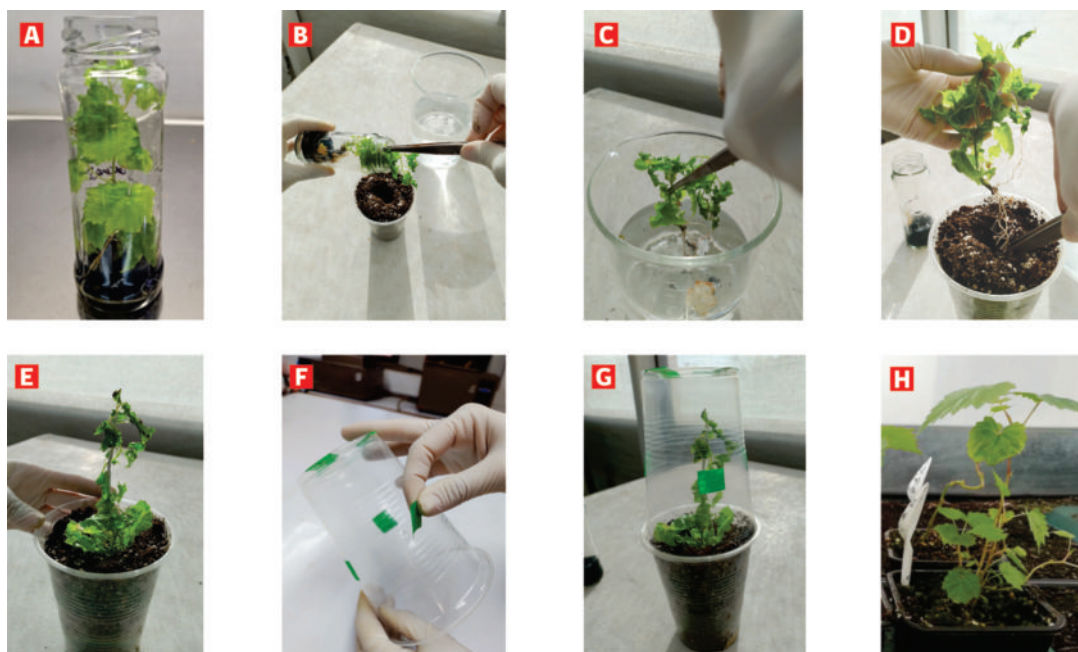


Figura 7.6. Proceso de aclimatación de plántulas cultivadas *in vitro*. A: Planta *in vitro* con raíz desarrollada, B y C: Eliminación de restos de medio de cultivo; D y E: Establecimiento en sustrato estéril; F: Preparación de contenedor plástico para cubrir plantas, el cual presenta perforaciones para intercambio de atmósfera que serán liberadas durante el proceso de aclimatación; G: Planta en proceso de aclimatación; H: Planta aclimatada.

Una vez que las plantas están aclimatadas se trasladan a un repositorio de plantas madres libres de virus, el cual corresponde a un invernadero que debe cumplir con las siguientes características: malla antiáfidos, doble puerta y aislamiento de las macetas con el suelo. En el repositorio se debe tener un control de vectores de virus y un monitoreo anual a cada planta mediante análisis de PCR, para corroborar su condición libre de virus. (Figura 7.7).



Figura 7.7. Repositorio de plantas madres libres de virus.

7.5. Bibliografía

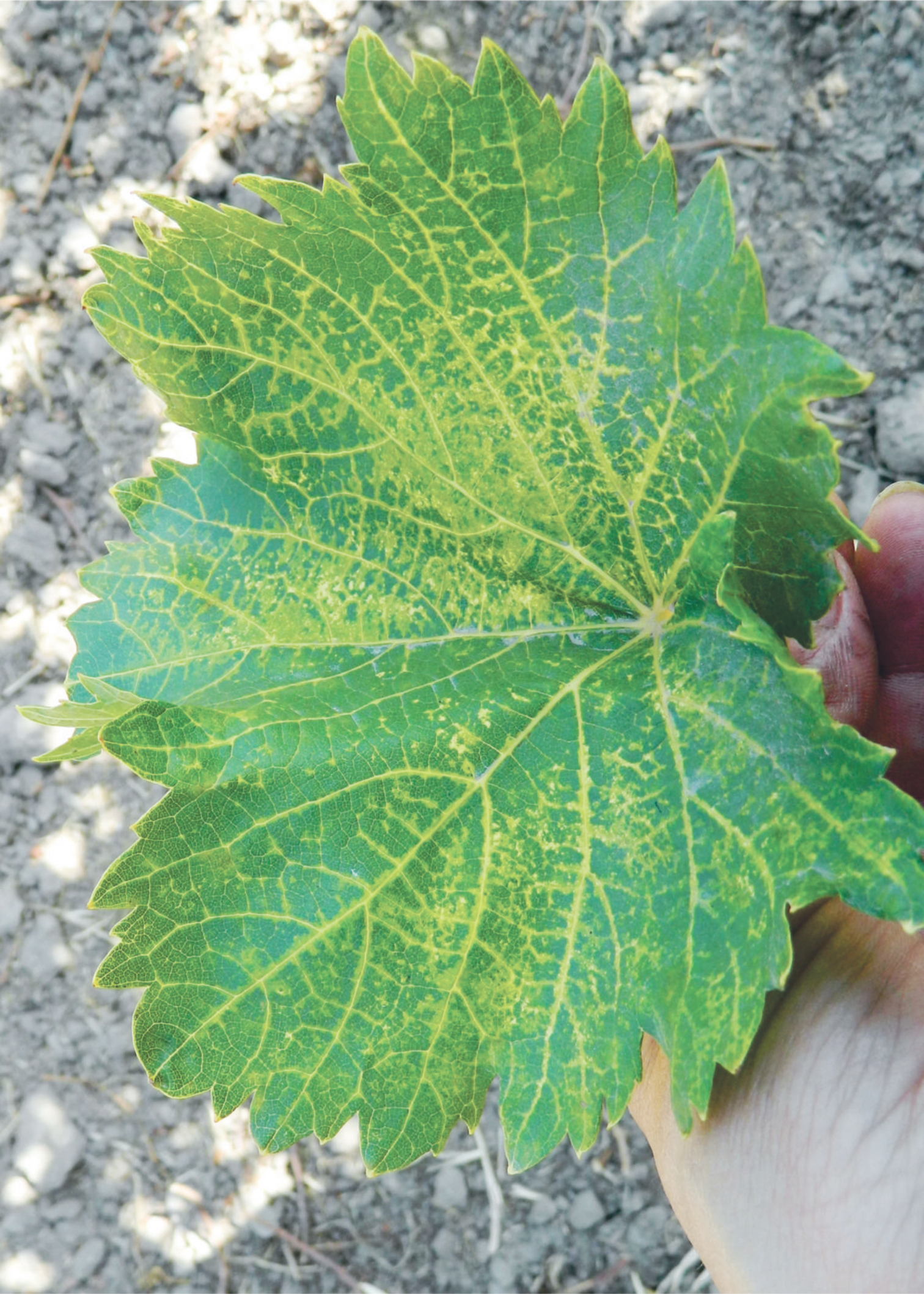
- AlMousa, R.N., y Hassan, N.A.-F. (2021). Cryopreservation of grape (*Vitis vinifera* L.) using encapsulation-dehydration technique. *Journal of Genetic and Environment Conservation*, 9(1), 153-156 <https://gercj.com/index.php/gercj/article/view/97>
- Benelli, C., Lambardi, M., y Fabbri, A. (2003). Low temperature storage and cryopreservation of the grape rootstock kober 5BB. *Acta Horticulturae*, 623, 249-253. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.623.27>
- Faccioli, G. (2001). Control of Potato Viruses using Meristem and Stem-cutting Cultures, Thermotherapy and Chemotherapy. En *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes* (pp. 365-390). https://doi.org/10.1007/978-94-007-0842-6_28
- Golino, D.A., Fuchs, M., Sim, S., Farrar, K., y Martelli, G.P. (2017). Improvement of Grapevine Planting Stock Through Sanitary Selection and Pathogen Elimination. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 561-579). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_27
- González, J.E., Sánchez, R., y Sánchez, A. (2006). Biophysical analysis of electric current mediated nucleoprotein inactivation process. *arXiv*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.q-bio/0601014>
- Grout, B.W.W. (1999). Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination. En *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 115-125). <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:115>
- Kunkel, L.O. (1936) Heat treatments for the cure of yellows and other virus Diseases of Peach. *Phytopathology*, 26(9), 809-830
- Leyssen, P., Balzarini, J., De Clercq, E., y Neyts, J. (2005). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity *in vitro* against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *Journal of Virology*, 79(3), 1943-1947. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1943-1947.2005>
- Liu, J., Zhang, X., Yang, Y., Hong, N., Wang, G., Wang, A., y Wang, L. (2016). Characterization of virus-derived small interfering RNAs in Apple stem grooving virus-infected *in vitro*-cultured *Pyrus pyrifolia* shoot tips in response to high temperature treatment. *Virology Journal*, 13(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0625-0>
- Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Hanász, A., Zsombik, L., y Dobránszki, J. (2021). Phytotoxicity and Other Adverse Effects on the *In vitro* Shoot Cultures Caused by Virus Elimination Treatments: Reasons and Solutions. *Plants*, 10(4), 670. <https://doi.org/10.3390/plants10040670>
- Maliogka, V.I., Skiada, F.G., Eleftheriou, E.P., y Katis, N.I. (2009). Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 123(2), 280-282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.08.016>
- Matsumoto, T., y Sakai, A. (2000). Cryopreservation of *in vitro*-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. *Acta Horticulturae*, 538, 177-181. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.538.28>

- Mochizuki, T., y Ohki, S.T. (2015). Detection of plant virus in meristem by immunohistochemistry and in situ hybridization. En *Methods in Molecular Biology*, 1236, 275-287. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_20
- Panattoni, A., Luvisi, A., y Triolo, E. (2013). Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), 173-188. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>
- Panattoni, A., y Triolo, E. (2010). Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on *in vitro* collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae*, 125(1), 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.001>
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F., y Panis, B. (2015). Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta Horticulturae*, 1083, 491-498. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1083.64>
- Salami, S., Ebadi, A., Zamani, Z., y Habibi, M. K. (2009). Distribution of GFLV in Iranian vineyards and improvements to sanitation protocols for production of virus-free grapevines. *Acta Horticulturae*, 829, 389-393. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.829.62>
- Smith, G.R., Fletcher, J.D., Marroni, V., Kean, J.M., Stringer, L.D., y Vereijssen, J. (2017). Plant pathogen eradication: Determinants of successful programs. *Australasian Plant Pathology*, 46(3), 277-284. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0489-9>
- Varveri, C., Maliogka, V.I., y Kapari-Isaia, T. (2015). Principles for supplying virus-tested material. *Advances in Virus Research*, 91, 1-32. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.004>
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., y Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L., y Wang, Q. C. (2018). *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, M. R., Bi, W. L., Bettoni, J.C., Zhang, D., Volk, G.M., y Wang, Q. C. (2022). Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. *Plant Pathology*, 71(6), 1241-1254. <https://doi.org/10.1111/ppa.13565>

Viroides y fitoplasmas (Virus-like) que afectan el cultivo de la vid

Capítulo

8



Viroides y fitoplasmas (Virus-like) que afectan el cultivo de la vid

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.

Isabel Ramírez A.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Este libro se ha centrado en diversos aspectos relacionados con los virus que afectan el cultivo de la vid en Chile y que son responsables de las principales enfermedades a nivel mundial. Se abordan temas como su taxonomía, caracterización, vectores, métodos de detección y control. Sin embargo, los autores consideran pertinente incluir un último capítulo dedicado a otros fitopatógenos, como viroides y fitoplasmas que, aunque no son virus, suelen ser estudiados por virólogos y se conocen como “organismos similares a virus” (*virus-like organisms*). En este capítulo se presentarán los aspectos más relevantes de estos fitopatógenos, junto con algunos resultados sobre su presencia en Chile.

8.1. Viroides

Los viroides son agentes infecciosos subvirales compuestos exclusivamente por una molécula circular de ácido ribonucleico (ARN) de simple hebra (246 a 434 nucleótidos) (Navarro *et al.*, 2021) que no posee marcos de lectura abiertos funcionales, por lo que no codifican proteínas. A diferencia de los virus, los viroides carecen de una cápside proteica (Figura 8.1).

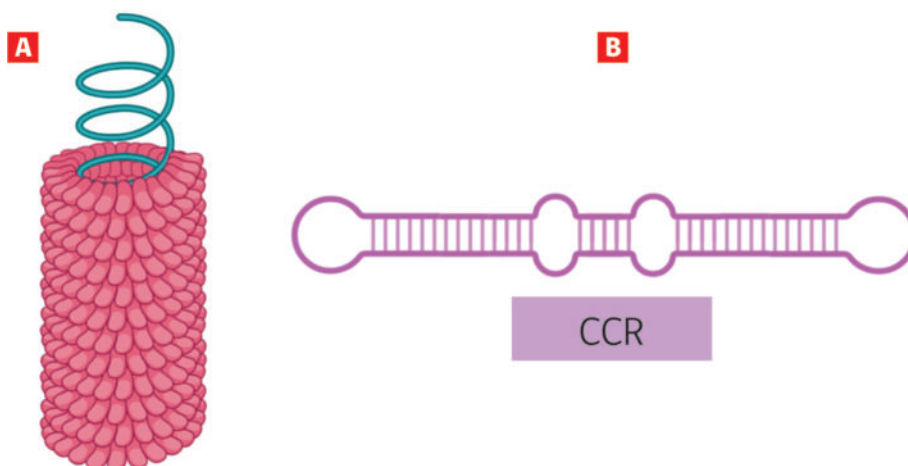


Figura 8.1. Comparación esquemática de un virus versus un viroide. A: Esquema general de un virus con su material genético (verde) recubierto de una cápside de proteína (rosa). B: Esquema general de un viroide de la familia *Pospiviroidae*, que consta del ARN circular en forma de varilla con una región conservada central (CCR).

Se reconocen dos familias de viroides: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, la cuales se diferencian entre sí por sus características moleculares.

Los *Pospiviroidae* poseen genomas de ARN circular de cadena simple, que adoptan una conformación en forma de varilla o cuasi-varilla, con una región central conservada involucrada en la replicación. Además los miembros de esta familia carecen de las ribozimas (Di Serio *et al.*, 2021).

Por otro lado, los *Avsunviroidae* presentan ARN circular que puede adoptar una conformación en forma de varilla o ramificada y presentan actividad de auto-escisión mediada por ribozimas, también se diferencian en que carecen de región central conservada y se replican y acumulan en los cloroplastos (Di Serio *et al.*, 2018).

El contenido de las bases nitrogenadas Citosina y Guanidina (C+G) en los viroides es particularmente alto, entre 53 % a 60 %, sin embargo, existen algunas excepciones como es el caso del viroide *Avocado Sunblotch* cuyo contenido sólo llega al 36 %.

Hasta la fecha, se han identificado 68 especies de viroides, agrupadas en ocho géneros. En el cultivo de la vid se han descrito cinco especies que la afectan, pertenecientes a tres géneros distintos de la familia *Pospiviroidae* (Cuadro 8.1).

Cuadro 8.1. Clasificación taxonómica de los viroides que afectan el cultivo de la vid.

Familia	Género	Especie	Nombre	Sigla
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Apscaviroid</i>	<i>Apscaviroid alphaflavivitis</i>	Grapevine yellow speckle viroid 1	GYSVd-1
		<i>Apscaviroid betaflavivitis</i>	Grapevine yellow speckle viroid 2	GYSVd-2
		<i>Apscaviroid austravitis</i>	Australian grapevine viroid	AGVd
	<i>Hostuviroid</i>	<i>Hostuviroid impedihumuli</i>	Hop stunt viroid	HSVd
	<i>Pospiviroid</i>	<i>Pospiviroid exocortiscitri</i>	Citrus exocortis viroid	CEVd

Los viroides en vides no manifiestan síntomas evidentes, a excepción de Grapevine yellow speckle viroid 1 y Grapevine yellow speckle viroid 2 (Figuras 8.2 y 8.3), los que causan un fino moteado alrededor de las venas principales de la hoja. Además, estas dos especies actúan en sinergia con el virus GFLV potenciando los síntomas del síndrome Vein banding disease (BVD) (Sección 3.1.1) (Figura 8.4). Es importante destacar que la transmisión de los viroides desde una planta a otra ocurre mediante herramientas de poda e injertos.



Figura 8.2. Hoja de vid proveniente de una planta infectada con GYSVd-1 y GYSVd-2. Se puede observar un fino moteado en torno a las venas principales.



Figura 8.3. Hoja de vid proveniente de una planta infectada con GYSVd-2. Se puede observar un moteado que causa amarillamiento en torno a las venas principales y que se expande hacia la lámina de la hoja.



Figura 8.4. Hoja de vid proveniente de una planta infectada con GFLV, GYSVd-1 y GYSVd-2. Se puede observar amarillamiento en torno a las venas principales y que se expande hacia la lámina de la hoja.

8.1.1. Viroides que afectan el cultivo de la vid en Chile

En Chile, se han descrito cuatro de las cinco especies de viroides asociadas al cultivo de la vid: HSVd, AGVd, GYSVd-1 y GYSVd-2. Trabajos realizados por el Laboratorio de Virología de INIA La Platina (Madariaga *et al.*, 2015), en donde se analizaron mediante PCR utilizando partidores específicos (Cuadro 8.2), 139 muestras provenientes de 37 variedades diferentes colectadas en la Región Metropolitana, permitieron estimar la prevalencia de estas especies de viroides. Los resultados indicaron que el 29,7 % de las variedades analizadas no presentó infección por viroides, un 35.1 % presentó infección simple, es decir, con sólo una especie de viroide. Las infecciones múltiples que correspondieron a mezclas de dos, tres y hasta cuatro especies de viroides en una planta fue de 21,6 %, 8,1 % y 5,4 %, respectivamente. El viroide más prevalente en las variedades fue HSVd (70,3 %). En segundo lugar de prevalencia se determinó a GYSVd-2 (32,4 %), mientras que CEVd no fue identificado en ninguna variedad (Cuadro 8.3).

Cuadro 8.2. Partidores utilizados para la identificación de viroides.

Tipo de patógeno	Nombre	Nombre del partidor	Secuencia 5' a 3'	Referencia bibliográfica
Viroide	Hop stunt viroid	HSVd-20F HSVd-19R	GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG CCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC	Astruc, N. <i>et al.</i> (1996)
	Australian grapevine viroid	AGVd-mF AGVd-mR	GTCCTCAGGAGAGCACCGG GAAAACTGGTTGGGACCGCTG	Hajizadeh, M. <i>et al.</i> (2012)
	Grapevine yellow speckle viroid 1	GYSVs-1-mF GYSVd-1-mR1	CAAAGCCCTTTTCTTTCAACTGAG CCCAGAGCAGCGTGGTCC	Hajizadeh, M. <i>et al.</i> (2012)
	Grapevine yellows speckle viroid 2	GYSVd-2-P1 GYSVd-2-P2	ACTAGTACTTTCTTCTATCTCCGAAGC ACTAGTCCGAGGACCTTTTCTAGCGCTC	Hajizadeh, M. <i>et al.</i> (2012)
	Citrus exocortis viroid	CEVd-mF CEVd-mR	GTGTCCTTCCTTCGCTGCTG TGGCCCGGAGAACAGTGAAG	Hajizadeh, M. <i>et al.</i> (2012)
Virus	Grapevine fanleaf virus	FLmulF FLmulR	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	Gambino, G. (2015)

Cuadro 8.3. Presencia de viroides en las 37 variedades de vid analizadas. Con un signo “+” se representa la presencia del viroide y con un signo “-” su ausencia.

Variedad	HSVd	AGVd	GYSVd-1	GYSVd-2
Autumn Seedless	-	-	-	-
Beauty Seedless	+	-	-	-
Big Red	+	-	-	-
Black Seedless	+	+	+	+
Blush Seedless	+	-	-	+
Calmería	+	+	+	+
Cardinal	-	-	-	-
Carmenere	+	-	-	-
Centinal Seedless	+	-	-	-
Chardonnay	+	-	+	-

Continuación Cuadro 8.3.

Variedad	HSVd	AGVd	GYSVd-1	GYSVd-2
Crimson Seedless	+	-	-	-
Csaba Gyöngye	+	-	-	+
Emperor	+	-	-	+
Exótica	+	-	-	-
Frankenthaler	-	-	-	-
Ilusión	-	-	-	-
Italia Pirovano	+	-	-	-
July Muscat	-	-	-	-
Koutiasky belyi	-	-	-	-
Kyoho	+	-	-	+
Maravilla de Málaga	-	-	-	-
Merlot	+	-	+	-
Monukka	-	-	-	-
Patagonia	+	-	-	-
Perlette	-	-	-	-
Perlón	+	-	-	+
Pinot Noir	+	-	+	+
Portugais Bleu	-	-	-	-
Queen	+	-	-	-
Red Globe	+	-	-	-
Retagliado Bianco	-	-	-	-
Ruby Cabernet	+	-	-	+
Ruby Seedless	+	+	-	+
San Francisco	+	-	-	-
Superior Seedless	+	+	-	+
Verdot	+	-	-	-
Zinfandel	+	-	-	+

Al analizar los resultados de las 139 muestras, independientemente de la variedad a la que pertenecen, se determinó una prevalencia general de infección del 59,7 %. Dentro del total de muestras infectadas, el viroide más prevalente fue HSVd con un 61,2 %, en concordancia con la literatura, que reporta su amplia distribución en diversas regiones vitícolas del mundo. Por otro lado, el viroide menos prevalente fue GYSVd-1, con un 4,3 % (Figura 8.5).

Estos resultados son consistentes con los reportados por Zamorano *et al.* (2015), quienes determinaron las mismas cuatro especies de viroides con prevalencias de 91 % para HSVd, 20 % para GYSVd-1, 10,9 % para GYSVd-2 y 9,1 % para AGVd.

Las 139 muestras también fueron analizadas para identificar el virus GFLV mediante PCR, siguiendo los pasos descritos en la sección 4.3.1, utilizando el mismo ARN para los análisis de viroides y los partidores indicados en el Cuadro 8.2. Esto se realizó con la finalidad de determinar la presencia del síndrome Vein banding disease (BVD) que es causado por el sinergismo entre GFLV y GYSVd-1 o GYSVd-2 (Figura 8.4). Los resultados indicaron la presencia de GFLV en un 22,1 % del total de las muestras analizadas y se encontró coexistiendo con los viroides GYSVd-1 o con GYSVd-2 en un 10,8 % de las muestras analizadas.

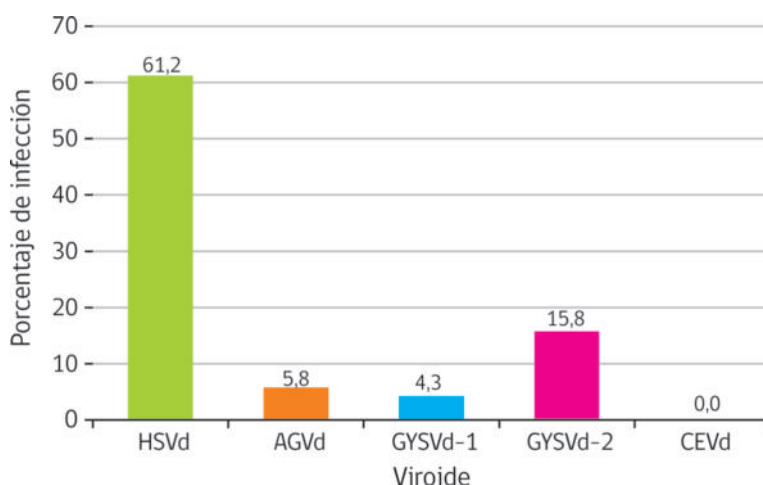


Figura 8.5. Porcentaje de infección de viroides en 139 plantas de vid analizadas.

Al corroborar la identidad de cada viroide determinado, mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados y la comparación con otras secuencias publicadas en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en NCBI, se pudo observar que el mayor porcentaje de identidad de cada fragmento secuenciado fue justamente con las secuencias de la especie de viroide que se esperaba.

8.2. Fitoplasmas

Los fitoplasmas son procariontes fitopatógenos que tienen un comportamiento de parásitos obligados y cuya primera visualización ocurrió en 1967 (Doi *et al.*, 1967). Los fitoplasmas están restringidos al floema de las plantas obstruyendo los tubos cribosos, por lo tanto, los productos de la fotosíntesis no pueden distribuirse correctamente, esto repercute en un desbalance de metabolitos en la planta que se manifiesta en síntomas tales como: deformaciones, amarilleces, disminución en la producción de fruta y hasta pueden causar la muerte del individuo afectado. Debido a esto son considerados causantes de un gran impacto económico negativo en la agricultura. Entre todos los fitoplasmas que afectan la vid a nivel mundial, la enfermedad conocida como Flavescencia dorada (FD) es considerada la más devastadora. El agente causal de esta enfermedad es '*Candidatus Phytoplasma vitis*'. Este fitoplasma se disemina mediante el cicadélido *Scaphoideus titanus* Ball que actúa como vector. Afortunadamente, este fitoplasma ni el insecto vector han sido determinados en Chile.

Los fitoplasmas se caracterizan morfológicamente por tener una estructura pleomórfica con una doble membrana, la cual es fácilmente observable bajo microscopía electrónica (Figura 8.6), son carentes de paredes celulares y su tamaño varía entre 200 a 800 nm de diámetro. Estos patógenos se multiplican mediante reproducción asexual, como la fisión binaria, proceso en donde la célula madre se divide en dos células hijas de igual tamaño; como también por gemación o división de células filamentosas en células más pequeñas.

Entre sus características moleculares se puede mencionar que el genoma varía de 530 a 1350 kb y tiene un contenido de Citosina y Guanidina (C+G) no mayor al 30 %. Mediante diferentes herramientas moleculares se ha logrado conocer el genoma completo de 27 fitoplasmas. Estos trabajos han permi-

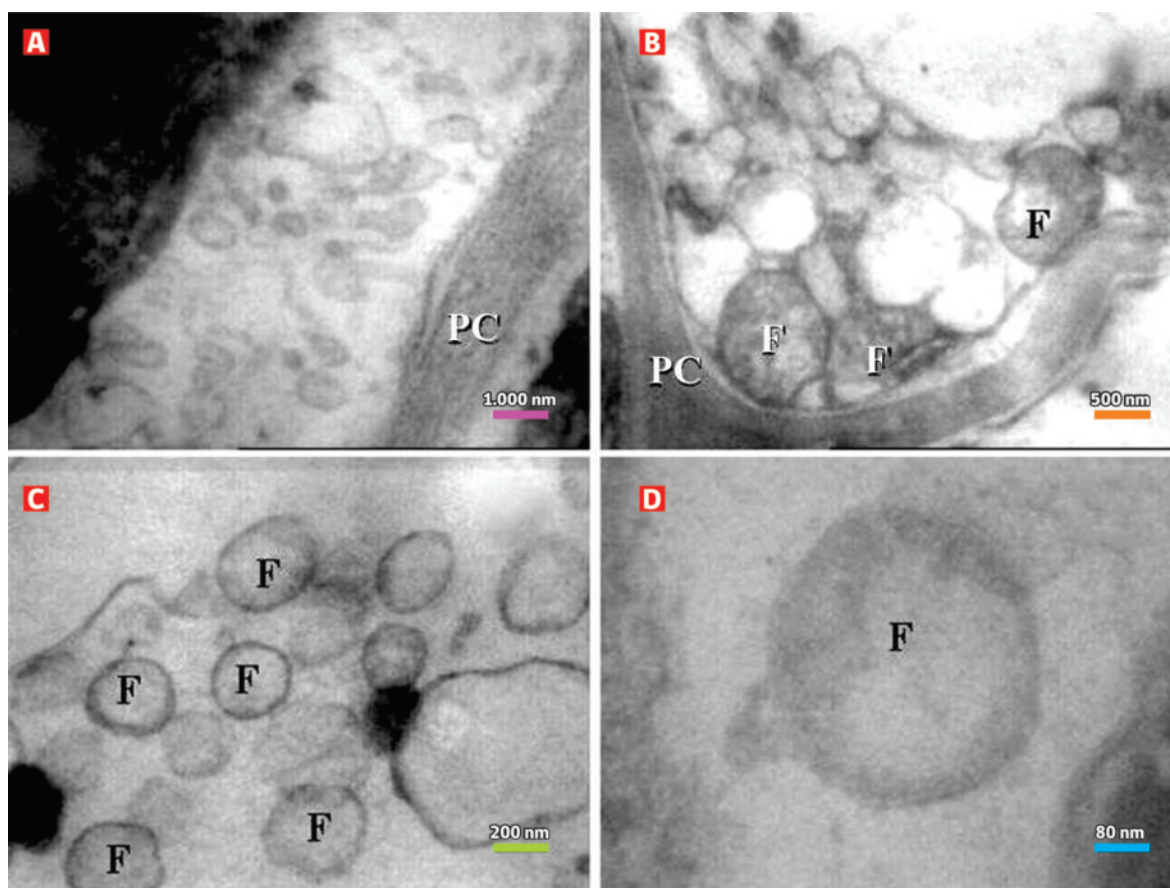


Figura 8.6. Imagen mediante microscopía electrónica de fitoplasmas en células del floema de pecíolos de hojas de plantas de vides mostrando síntomas de amarillez. A: Sección de citoplasma de célula de tejido conductor mostrando cuerpos ovoidales y elongados. Barra 1000 nm. B: Sección de citoplasma de célula de tejido conductor en proceso de desintegración producto de la presencia de fitoplasmas. Barra 500 nm. C: Numerosos cuerpos ovooidales presentes en el citoplasma. Barra 200 nm. D: Detalle de fitoplasma encontrado en el citoplasma de tejido conductor. Barra 80 nm. PC= pared celular; F= fitoplasma (Fuente: Herrera y Madariaga 2003).

tido conocer poco a poco algunas características, por ejemplo, que los fitoplasmas han perdido genes implicados en vías metabólicas importantes, haciéndolos dependientes de su hospedero e imposibilitando su cultivo fuera de éste.

La forma de diseminación de los fitoplasmas en general, es mediante injerto, sin embargo, también existen vectores que se encargan de moverlos de una planta a otra. Estos vectores son insectos pertenecientes a las familias *Cicadellidae* y *Cixiidae*, que realizan la transmisión mediante la modalidad persistente propagativa, es decir, el vector adquiere el fitoplasma al alimentarse de una planta infectada, el cual ingresa al aparato circulatorio del insecto hasta alcanzar las glándulas salivales, desde donde ingresará a un nuevo hospedero cuando el insecto se alimente. El insecto, una vez que ha adquirido el fitoplasma, permanecerá infectado y transmitirá el patógeno por el resto de su vida.

Los síntomas típicos causados por fitoplasmas en distintas especies vegetales son amarillamientos, escobas de brujas, filodia, virescencia, enanismo, entre otros (Figuras 8.7 y 8.8). Los síntomas normalmente inician en un sector de la planta y luego se va distribuyendo hacia la totalidad del hospedero.



Figura 8.7. Síntoma de escoba de brujas en calafate.



Figura 8.8. Síntoma de enrollamiento de hojas en cerezo causado por fitoplasma.

El control de este fitopatógeno se basa en aplicaciones de tetraciclina, no obstante, la inviabilidad económica de tratar los árboles con este antibiótico hace que las plantas infectadas con fitoplasmas queden sin tratamiento, siendo el arranque de ellas la única solución junto con el control químico de los insectos vectores.

8.2.1. Clasificación taxonómica y diagnóstico

La clasificación oficial de los fitoplasmas está bajo la tutela del International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, quienes han clasificado a estos patógenos dentro de la clase Mollicutes y el género "*Candidatus phytoplasma*".

Cuando los fitoplasmas fueron visualizados por primera vez, se observó que su estructura era muy similar a la de los micoplasmas que afectan a humanos y animales (Doi *et al.*, 1967). Por esta razón, inicialmente se les denominó **Organismos Similares a Micoplasmas** (MLO, por sus siglas en inglés *Mycoplasma-like Organism*). Sin embargo, en 1993, al secuenciar el gen 16S rRNA de un MLO, se descubrió que su secuencia era significativamente diferente a la de los micoplasmas. A partir de entonces, los MLO comenzaron a ser designados con el nombre de **fitoplasmas**.

Los primeros parámetros utilizados para la clasificación de los fitoplasmas se basaron en la sintomatología, hospederos e insectos vectores. Más tarde, con la disponibilidad de herramientas moleculares como la secuenciación genética, se pudo identificar hasta el taxón especie. La identificación completa de los fitoplasmas incluye, además de la especie, el grupo e incluso subgrupos, los cuales se obtienen desde secuencias del gen 16S rRNA y el análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) realizado en dichas secuencias con 17 enzimas de restricción (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*).

Por lo tanto, el procedimiento para identificar y clasificar los fitoplasmas considera tres pasos: PCR simple o anidado utilizando partidores universales (Cuadro 8.4) que amplifican un fragmento del gen 16 rRNA, secuenciación del fragmento amplificado y, finalmente, un análisis de RFLP de la secuencia obtenida. Este último análisis se puede realizar *in silico*, utilizando la herramienta de libre disposición iPhyClassifier (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zhao *et al.*, 2009).

Cuadro 8.4. Partidores universales utilizados para la identificación de fitoplasmas.

Nombre del partidor	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del fragmento amplificado	Referencia
P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1.7 kb	Deng y Hiruki (1991); Schneider <i>et al.</i> , (1995)
R16mF2 R16mR1	CATGCAAGTCGAACGGA CTTAACCCCAATCATCGAC	1.4 kb	Gundersen y Lee (1996); Lee <i>et al.</i> , (1993)
R16F2n R16R2	GAAACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1.2 kb	Gundersen and Lee (1996); Lee <i>et al.</i> , (1993)

Los fitoplasmas se encuentran distribuidos en forma desigual en la planta, por lo cual es recomendable tomar muestras en las zonas con sintomatología como: virescencia, filodia, escoba de bruja, alteraciones del color de las hojas, tamaño reducido de hojas y frutos, necrosis del floema, decaimiento general y retraso del crecimiento, entre otros (Davis y Sinclair, 1998). Además, dado que este fitopatógeno se encuentra en el floema, es conveniente para la extracción de ADN utilizar peciolo, nervaduras medias de las hojas, tallos o la corteza interna.

8.2.2. Fitoplasmas que afectan el cultivo de la vid en Chile

En Chile, los primeros reportes de evidencias de fitoplasmas en la vid datan del año 2003 (Herrera y Madariaga, 2003). Actualmente se han detectado fitoplasmas causantes de la enfermedad amarillamiento de la vid (Gajardo *et al.*, 2009; Fiore *et al.*, 2015; Quiroga *et al.*, 2020), los cuales se encuentran bajo seis subgrupos ribosomales indicados en el Cuadro 8.5.

Respecto de la sintomatología que causan estos patógenos en la vid, no son muy diferentes a lo descrito anteriormente, donde las plantas infectadas manifiestan cambios de color en la lámina de la hoja; en el caso de las variedades de uva blancas muestran un amarillamiento brillante (dorado), mientras que las variedades tintas tornan sus hojas a un color rojo oscuro (Figura 8.9). También se puede observar el enrollamiento de las hojas hacia el envés (Figura 8.10), deshidratación de bayas, falta de vigor en la planta, lignificación parcial de los sarmientos, entre otras.

Cuadro 8.5. Clasificación de los fitoplasmas identificados en la vid en Chile.

Nombre	Subgrupo ribosomal	Referencia bibliográfica
<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris	16SrI-B 16SrI-C,	Gajardo <i>et al.</i> , (2009) Gajardo <i>et al.</i> , (2009)
<i>Candidatus</i> Phytoplasma. fraxini	16SrVII-A	Gajardo <i>et al.</i> , (2009)
<i>Candidatus</i> Phytoplasma pruni-related	16sRIII-J	Fiore <i>et al.</i> , (2015)
<i>Candidatus</i> Phytoplasma ulmi	16SrV-A	Fiore <i>et al.</i> , (2015)
<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani	16SrXII-A	Gajardo <i>et al.</i> , (2009)



Figura 8.9. Planta de vid variedad tinta infectada con fitoplasma. Se puede observar el cambio de color de las hojas de la ramilla afectada y el enrollamiento de ellas.



Figura 8.10. Planta de vid infectada con fitoplasmas. Se puede observar el enrollamiento hacia el envés de las hojas.

8.3. Bibliografía

- Astruc, N., Marcos, J. F., Macquaire, G., Candresse, T., y Pallás, V. (1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102(9), 837-846. <https://doi.org/10.1007/bf01877053>
- Davis, R. E., & Sinclair, W. A. (1998b). Phytoplasma Identity and Disease Etiology. *Phytopathology*, 88(12), 1372-1376. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.12.1372>
- Deng, S., y Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-d](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-d)
- Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R. A., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. Th. J., Vidalakis, G., Flores, R., y ICTV Report Consortium. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Avsunviroidae. *Journal of General Virology*, 99(5), 611-612. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>
- Di Serio, F., Owens, R. A., Li, S., Matoušek, J., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. T. J., Vidalakis, G., & Flores, R. (2020). ICTV Virus taxonomy Profile: Pospiviroidae. *Journal Of General Virology*, 102(2). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001543>
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., y Asuyama, H. (1967). Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom. *Japanese Journal of Phytopathology*, 33(4), 259-266. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>
- Fiore, N., Zamorano, A., y Pino, A.M. (2015). Identification of phytoplasmas belonging to the ribosomal groups 16SrIII and 16SrV in Chilean grapevines. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1), 32-36. <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00060.2>
- Gajardo, A., Fiore, N., Prodan, S., Paltrinieri, S., Botti, S., Pino, A.M., Zamorano, A., Montealegre, J., y Bertaccini, A. (2009) Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows Disease in Chile. *Plant Disease*, 93(8), 789-796. <https://doi.org/10.1094/pdis-93-8-0789>
- Gambino, G. (2015). Multiplex RT-PCR Method for the Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses. *En Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1236. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_4
- Gundersen, D. E., y Lee, I.-M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144-151. <https://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hajizadeh, M., Navarro, B., Bashir, N. S., Torchetti, E. M., y Di Serio, F. (2012). Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. *Journal of Virological Methods*, 179(1), 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.022>
- Herrera M., Guido, Madariaga V., Mónica (Ene-Mar 2003). Evidencias inmunológicas, microscópicas y moleculares de la presencia de fitoplasmas en vides [en línea]. *Agricultura Técnica*. v. 63(1) p. 15-22. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/39935>

- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., y Gundersen, D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83(8), 834-842. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-834>
- Madariaga, M., Ramírez, I., Moreno, S. y Salazar, E. (2015). Estudio de la prevalencia de infecciones causadas por viroides en una colección de *Vitis vinífera*. Libro de resúmenes XXIV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Viña del mar, Chile
- Navarro, B., Flores, R., y Serio, F. D. (2021). Advances in Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Virology*, 8(8), 305-325. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-092331>
- Quiroga, N., Gamboa, C., Soto, D., Pino, A. M., Zamorano, A., Campodonico, J., Alma, A., Bertaccini, A., y Fiore, N. (2020). Update and New Epidemiological Aspects about Grapevine Yellows in Chile. *Pathogens*, 9(11), 933. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110933>
- Schneider, B., Seemueller, E., Smart, C.D., y Kirkpatrick, B.C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic micoplasma-like organisms or phytoplasmas. En *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (pp. 369-380). <https://doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50040-6>
- Zamorano, A., González, X., Quiroga, N., & Fiore, N. (2015). Detection and characterization of chilean isolates of grapevine viroids. En *Proceedings of the 18th Congress of ICVG, Ankara, TURKEY | 7-11 September 2015* OP26. <https://icvg.org/data/icvg-2015-abstract.pdf>
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.M., Shao, J., Suo, X., y Davis, R.E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2582-2593. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.010249-0>



Glosario

- **Ácidos nucleicos:** moléculas orgánicas complejas (ADN y ARN) que almacenan y expresan la información genómica de células o virus.
- **Agentes infecciosos subvirales:** entidades patógenas más simples que los virus, es decir, carecen de propiedades fundamentales de los virus, pero que pueden causar una enfermedad.
- **Amplicom:** segmento de ADN que ha sido amplificado mediante PCR.
- **Anticuerpo monoclonal:** molécula proteica idéntica producida por un solo clon de células B, diseñada para reconocer y unirse a un antígeno específico.
- **Anticuerpo policlonal:** mezcla de anticuerpos producidos por diferentes clones de células B, cada uno reconociendo un epítipo diferente del mismo antígeno.
- **Antocianinas:** pigmentos que se encuentran en las plantas. Son responsables de la amplia gama de colores que van desde el rojo intenso hasta el azul profundo.
- **Apantallador:** llamado también "quencher". Molécula diseñada para inhibir la emisión de luz de un fluoróforo cuando ambos están en estrecha proximidad. En qPCR, los apantalladores se utilizan en sondas moleculares para inhibir la fluorescencia del reportero, cuando la polimerasa degrada la sonda durante la amplificación, el fluoróforo se separa del apantallador.
- **Asintomático:** que no presenta síntomas. Esto no implica ausencia de virus.
- **Bases nitrogenadas:** componentes fundamentales de los ácidos nucleicos. Existen dos tipos de bases nitrogenadas: purinas (adenina y guanina); y pirimidinas (citosina y timina en el ADN y uracilo en el ARN).
- **Canopia:** en un parronal se refiere al conjunto de hojas, sarmientos y racimos de uva que conforman la parte aérea de la planta.
- **Cápside viral:** es la cubierta proteica que envuelve el material genético de un virus.
- **Citoquininas:** son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) que tienen entre sus funciones la división celular, el crecimiento de brotes, la formación de raíces entre otras.
- **Condiciones *in vitro*:** son las condiciones artificiales que se le entregan a una planta que está siendo cultivada *in vitro* (en un frasco estéril), para que esta pueda desarrollarse adecuadamente. Las condiciones *in vitro* corresponden a temperatura, nutrientes, pH, hormonas de crecimiento, gases, entre otros.
- **Control biológico:** definido como el uso consciente de organismos vivos para el control de plagas. Es un recurso ecosistémico clave para la producción sostenible de cultivos, en el cual se aprovechan los enemigos naturales de estas para reducir sus daños.

- **dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfatos. Bloques de construcción del ADN, compuestos por un azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T).
- **Desfosforilado:** molécula a la que se le ha eliminado un grupo fosfato.
- **Diapausa:** es una suspensión en el desarrollo que puede ocurrir como embrión, pupa o adulto. En algunas especies, la diapausa es facultativa y ocurre únicamente cuando es inducida por condiciones ambientales; en otras especies, el período de diapausa es una parte obligatoria del ciclo de vida.
- **Dimorfismo:** condición de las especies animales o vegetales que presentan dos formas o dos aspectos anatómicos diferentes.
- **Dípteros:** insectos con alas. Incluye grupos tan conocidos como las moscas y mosquitos, además de muchos otros.
- **Eclosión:** es el proceso mediante el cual los huevos rompen su envoltura para permitir la salida o nacimiento del organismo.
- **Edafoclimáticas:** las características edafoclimáticas se refieren a factores ambientales que describen las condiciones del suelo y del clima en un lugar determinado.
- **Enfermedad latente:** es una infección viral que no causa ningún síntoma visible en la planta. El virus puede estar presente durante muchos años sin causar ningún daño. Sin embargo, el virus puede transmitirse a otras plantas, pudiendo activarse y causar síntomas bajo ciertas condiciones, como el estrés o los cambios ambientales.
- **Enzima:** molécula de naturaleza proteica que promueve o permite que tenga lugar una reacción química.
- **Epítomos:** regiones específicas de un antígeno que son reconocidas por los anticuerpos.
- **Época estival:** estación del verano.
- **Estilete:** apéndice alargado y afilado que permiten al insecto perforar tejidos vegetales y succionar fluidos.
- **Estructura de horquilla:** estructura secundaria del ADN o ARN formada por el apareamiento de bases complementarias dentro de una misma cadena.
- **Eucariotas:** son un tipo de célula que se caracteriza por tener un núcleo definido y rodeado por una membrana. Este núcleo alberga el material genético de la célula, el ADN.
- **Explante:** término que se utiliza para referirse a un pequeño trozo de tejido vivo que se extrae de la planta que se cultiva *in vitro*.
- **Feromonas:** sustancias producidas por los seres vivos; capaces de modificar el comportamiento del individuo que las percibe, desencadenando una respuesta social.
- **Filodia:** corresponde a la transformación de los órganos florales en estructuras que toman la forma de hojas. Este síntoma es causado por la infección de fitoplasmas.

- **Filoxera:** es un insecto hemíptero, originario de América del Norte, que se alimenta de las raíces de la vid provocando la muerte de la planta. A mediados del siglo XIX se convirtió en una de las plagas más devastadoras para los viñedos de Europa.
- **Fisión binaria:** es un tipo de reproducción asexual en la que una única célula madre se divide en dos células hijas idénticas.
- **Fitófago:** que se alimenta de materias vegetales.
- **Floema:** tejido vivo de las plantas vasculares que transporta sustancias orgánicas e inorgánicas de una parte a otra de estos organismos.
- **Fluorescencia:** emisión de luz por parte de una molécula, llamada fluoróforo o fluorocromo.
- **Fluorocromo:** molécula que emite luz cuando absorbe energía en forma de luz de una longitud de onda determinada.
- **Fumagina:** es una capa oscura que corresponde al crecimiento de varias especies de hongos, cuyo micelio y esporas negras cubren la superficie de su planta hospedera. Estos hongos saprófitos no infectan los tejidos del vegetal, por lo que el daño producido es más bien de tipo cosmético. Sin embargo, llega a tener efectos negativos en la fotosíntesis, al bloquear directamente la luz. La fumagina puede ser un importante problema al presentarse como manchas sobre la fruta y vegetales, disminuyendo su calidad y su precio.
- **Gemación:** es un tipo de reproducción asexual en la que se desarrolla un nuevo organismo a partir de una extensión (brote) del organismo original. Este brote eventualmente se desprende y se convierte en un individuo independiente, genéticamente idéntico al padre.
- **Gen:** secuencia nucleotídica que contiene información genética de la planta y que codifica para una proteína. Un gen contiene exones e intrones.
- **Genoma:** es el conjunto completo de material genético de un organismo organizado en genes. Incluye todas las secuencias de ADN o ARN que se encuentran en los cromosomas, así como cualquier ADN extracromosómico, como el que se encuentra en las mitocondrias y los cloroplastos. El genoma contiene las instrucciones para construir y mantener las características de un organismo, y se transmite de padres a hijos a través de la reproducción.
- **Guanosina:** es un nucleósido compuesto por la base nitrogenada guanina unida a un azúcar ribosa mediante un enlace glucosídico. Su estructura molecular sirve como base para la creación de numerosos fármacos antivirales.
- **Heterometábolo:** es un tipo de desarrollo postembrionario en insectos, caracterizado por el progresivo crecimiento de las alas a partir de unos pequeños esbozos alares, denominados pterotecas.
- **Hiperhidricidad:** desarrollo excesivo de tejido acuoso en las plantas regeneradas. Esta condición puede afectar negativamente el crecimiento y la supervivencia de las plantas *in vitro*, ya que puede provocar pudrición, marchitamiento y otras anomalías fisiológicas.
- **Holometábolo:** también llamado metamorfosis completa, es una forma de desarrollo de los insectos que incluye cuatro etapas de vida: huevo, larva, pupa e imago (o adulto).

- **Hospedero:** es una planta viva en la cual un virus se replica.
- **Indexación biológica:** es una técnica de diagnóstico que utiliza plantas indicadoras para detectar la presencia de virus en material vegetal. Se basa en la sensibilidad de ciertas especies herbáceas o leñosas frente a un virus determinado, por lo cual la planta indicadora desarrolla síntomas específicos que pueden ser utilizados para identificar el virus.
- **Linfocitos:** tipo de glóbulo blanco involucrado en la respuesta inmunitaria, incluyendo la producción de anticuerpos.
- **Manejo integrado:** es la utilización de todas las técnicas de tratamiento y manejo disponibles, que permite mantener a las poblaciones plaga bajo el nivel de daño económico, protegiendo la salud humana y cuidando el medioambiente.
- **Marco de lectura abierto (ORF):** es una secuencia de nucleótidos en el ADN o ARN que tiene el potencial de ser traducida a una proteína.
- **Metabolismo:** es un conjunto de reacciones químicas que ocurre en las células y su función es sintetizar o degradar sustancias con el fin de que el organismo pueda funcionar y desarrollarse.
- **Metagenómica:** estudio de todo el material genético en una muestra. La metagenómica permite analizar la diversidad genética de comunidades de microorganismos completos, proporcionando información sobre su composición, función y evolución.
- **Meristema:** es un tejido vegetal formado por células indiferenciadas con una alta capacidad de división celular. Estas células son responsables del crecimiento continuo de las plantas.
- **Micrografting:** es una técnica que combina el cultivo de tejidos vegetales y métodos de injerto tradicionales. Consiste en injertar plantas que se encuentran en cultivo *in vitro*, por lo que se debe realizar bajo condiciones asépticas.
- **Millerandage:** fenómeno que ocurre en los racimos de uva, caracterizado por la presencia de granos de diferentes tamaños y grados de madurez dentro del mismo racimo.
- **Muda:** en nemátodos es el proceso biológico mediante el cual estos pequeños gusanos se desprenden de su cutícula —una especie de exoesqueleto— para poder crecer.
- **Mutaciones somaclonales:** son cambios genéticos que ocurren en las células somáticas. En el contexto del cultivo *in vitro*, estas mutaciones se producen en las células vegetales que se cultivan en condiciones artificiales en un laboratorio. Estas mutaciones pueden ocurrir debido a que el cultivo *in vitro* expone a las células vegetales a condiciones de estrés que no se encuentran en la naturaleza.
- **Neuropteros:** insectos que pertenecen al orden Neuroptera (que significa alas con nervios). Es un grupo de insectos de distribución mundial que presenta su máxima diversidad en las áreas tropicales.
- **Ninfa:** es una etapa inmadura en el desarrollo de ciertos insectos. La ninfa tiene una forma similar a la del adulto.
- **Open gable:** tipo de estructura de soporte para las vides (sistema de conducción).

- **Ovíparos:** que nacen de huevo.
- **Ovipostura:** proceso de puesta de los huevos en un sitio adecuado para su eclosión, desarrollo larvario y emergencia hasta adulto.
- **Ovisaco:** cavidad o estructura en el ovario que contiene o en la cual se depositan los huevos, común en insectos de algunas familias del orden Hemíptera. Los ovisacos protegen los huevos de condiciones ambientales adversas y del ataque de hongos.
- **Partenogénesis:** proceso reproductivo en el que los huevos se desarrollan en individuos completos sin la necesidad de fertilización por un macho.
- **Partidor:** secuencia corta de ADN o ARN que define los puntos inicial y final del proceso de amplificación del ADN. También se conocen como cebadores. Son esenciales en la PCR, pues se unen regiones específicas de la secuencia de ADN objetivo, guiando a la enzima polimerasa para iniciar y extender la reacción de síntesis de ADN.
- **Patógeno:** microorganismo que causa una enfermedad en su huésped.
- **Phylum:** es un rango taxonómico importante en la clasificación biológica de organismos. Se encuentra bajo el taxón Reino y sobre el taxón Clase.
- **Planta madre:** es una planta de la cual se toman esquejes u otros propágulos para crear nuevas plantas. Esta planta suele estar sana y tiene rasgos deseables que se desean replicar en las nuevas plantas.
- **Plantas indicadoras:** especies vegetales que son sensibles a un virus específico o a un grupo de virus relacionados.
- **Pleomórfica:** término utilizado en biología e indica múltiples formas. En el contexto de células indica que estas tienen distintas forma y tamaños.
- **Poliadeninas:** es una cadena de nucleótidos de adenina que se añaden al extremo 3' de un ARN mensajero. En el genoma de un virus, las poliadeninas, también llamadas colas Poli-A, tienen como función proteger al genoma viral de ser degradado por las enzimas celulares.
- **Poliproteína:** por definición, es una cadena polipeptídica grande y única que se sintetiza a partir de una molécula de Ácido ribonucleico mensajero (mARN). En el contexto de la virología, es una estrategia que utilizan los virus para traducir el ARN viral y, luego, mediante proteasas virales, se escinde en proteínas funcionales individuales.
- **Pupa:** es el estado por el que pasan algunos insectos en el curso de la metamorfosis que los lleva del último estado de larva al de imago o adulto.
- **Prevalencia:** es la proporción de individuos de una población vegetal que están infectados con un virus específico en un momento determinado. Se expresa como un porcentaje.
- **Primordio foliar:** es la primera etapa en el desarrollo de una hoja, que aún no ha alcanzado su forma y tamaño definitivos. Se observa como un abultamiento o protuberancia en el meristemo apical.
- **Procarionte:** organismo unicelular que carece de núcleo definido y organelos membranosos.

- **Reactividad cruzada:** fenómeno en que un anticuerpo se une de forma errónea a un antígeno estructuralmente similar, pero no idéntico al que fue diseñado para reconocer.
- **Región conservada:** es una secuencia de nucleótidos del genoma viral que se ha mantenido relativamente sin cambios a lo largo del tiempo evolutivo. Esta región se ubica normalmente en el sector 3' del genoma viral.
- **RFLP:** sigla de la palabra en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism, que es una técnica utilizada en biología molecular para estudiar variaciones en secuencias de ADN homólogas entre diferentes individuos, poblaciones o especies.
- **Reportero:** en el contexto de la PCR cuantitativa (qPCR), un reportero es una molécula fluorescente que se utiliza para detectar y cuantificar la amplificación del ADN.
- **Sales caotrópicas:** compuestos químicos que pueden desnaturalizar proteínas y ácidos nucleicos.
- **Secreción ostiolar:** secreción generada por los chanchitos blancos, la que se relaciona con procesos de protección o defensa.
- **Silenciamiento génico:** proceso celular por el cual se inhibe la expresión de genes endógenos y exógenos.
- **Síndrome:** conjunto de síntomas que ocurren juntos en un hospedero y que indican una enfermedad en particular.
- **Síntoma:** manifestación que realiza la planta en cualquiera de sus estructuras, cuando tiene una infección. Los síntomas causados por el virus pueden ser mosaicos, deformaciones, necrosis, enanismo, clorosis, entre otros.
- **Síntoma de escobas de brujas:** corresponde a una proliferación de brotes adventicios o axilares causados por la presencia de fitoplasmas.
- **Sistema de canopia horizontal:** es un método de conducción de la planta que busca distribuir el follaje de manera horizontal, en oposición a los sistemas verticales más tradicionales. Esta configuración tiene como objetivo optimizar la captura de luz solar, mejorar la ventilación y facilitar las labores culturales en el viñedo, por ejemplo, el parrón español o pérgola.
- **Sistema de certificación de plantas:** es un programa que está diseñado para garantizar que las plantas cumplan con ciertos estándares de calidad, sanidad e identidad varietal.
- **Tampón:** solución que resiste los cambios de pH, utilizada para mantener condiciones estables en experimentos biológicos.
- **Traducción:** es el proceso mediante el cual el virus genera proteínas utilizando la información genética contenida en su genoma. El virus logra este proceso usando la maquinaria metabólica del hospedero.
- **Transcriptasa reversa:** enzima de tipo ADN-polimerasa cuya función es sintetizar ADN de doble cadena, utilizando como templado una molécula de ARN.

- **Transmisión semipersistente no circulativa:** es un tipo de transmisión viral en la que el virus se adhiere al estilete del insecto vector durante la alimentación y luego se inocula mecánicamente en la siguiente planta de que se alimenta el insecto. El virus no se replica dentro del insecto vector y solo se transmite por un período de tiempo limitado, generalmente de unos pocos días a unas pocas semanas.
- **Variedad:** una variedad botánica es una subcategoría taxonómica que agrupa a plantas de una misma especie que comparten características morfológicas o genéticas particulares.
- **Variedades apirenas:** variedades que no tienen semilla o que contienen una semilla rudimentaria.
- **Variación somaclonal:** modificaciones en el ADN de células regeneradas en cultivos *in vitro*. Estas modificaciones pueden ser mutaciones puntuales (cambios en un solo nucleótido de la secuencia de ADN), deleciones (pérdida de uno o más fragmentos de ADN), duplicaciones (ganancia de uno o más fragmentos de ADN) o rearrreglos cromosómicos (cambios en la estructura de los cromosomas).
- **Vinificación:** son los procesos mediante los cuales el jugo de la uva, conocido como mosto, se transforma en vino.
- **Virescencia:** corresponde a la transformación de los órganos florales en hojas. Por lo tanto, pierden los pigmentos normales.
- **Virus emergente:** es un virus que tiene como características el haber aparecido recientemente, y aumentar notablemente su incidencia y diseminación a diferentes áreas geográficas.
- **Vitrificación:** es una técnica de enfriamiento rápido que transforma el material vegetal en un estado vítreo y no cristalino para preservar la integridad celular, y evitar daños durante el proceso de congelación. Este estado vitrificado minimiza la formación de cristales de hielo, que pueden alterar las estructuras celulares y provocar la muerte celular.
- **Vivíparos:** dan a luz a crías vivas en lugar de poner huevos.



**Virus que afectan el cultivo
de la vid en Chile**
Descripción, diagnóstico y estrategias de control

