

Centro Regional de Diagnóstico (Junta de Castilla-León). Apdo. 61. 37080 Salamanca¹

Dpto. Protección de Cultivos. CIT-INIA. Apdo. 8111. 28080 Madrid²

Dpto. Agroecología. CCMA-CSIC. Serrano, 115 bis, 28006 Madrid³. España

CORRELACIÓN ENTRE *XIPHINEMA INDEX* Y EL VIRUS DEL ENTRENADO CORTO EN LOS VIÑEDOS DE CASTILLA LEÓN (ESPAÑA CENTRAL)

por

P. GARCÍA - BENAVIDES¹, J. LÓPEZ-ROBLES³, J. FRESNO² y M. ARIAS³

Resumen. Se evalúa el estado de los viñedos de Castilla León (España Central) respecto a enfermedades viróticas. Se analizan un total de 4.943 muestras pertenecientes a 1.188 parcelas de 95 municipios correspondientes a las Denominaciones de Origen de El Bierzo, Cigales, Ribera de Duero, Rueda y Toro y a la Denominación Específica de Cebreros a fin de comprobar la presencia del virus de la degeneración infecciosa de la vid (GFLV). Se realizó el estudio mediante el diagnóstico inmunoenzimático ELISA. Asimismo, se analiza la correlación de la virosis con su nematodo vector *Xiphinema index* en un total de 110 muestras positivas de GFLV. Los resultados indican que la incidencia del virus en los viñedos de Castilla León es de un 12,8% con una correlación virus-vector de un 31%.

Summary. Correlation between *Xiphinema index* and the grapevine fanleaf virus disease in vineyards of Castilla León (Central Spain). An evaluation of virus disease in Castilla León (Central Spain) vine growing areas is carried out. A total of 4,934 grapevine samples from 95 localities from the Origin Denomination of El Bierzo, Cigales, Ribera de Duero, Rueda and Toro and the specific denomination of Cebreros were analyzed for the presence of grapevine fanleaf virus (GFLV). The immunoenzymatic test ELISA was used for virus detection. Studies on correlation between virus presence and vector nematode *Xiphinema index* were carried out on a total of 110 soil samples taken around infected grapes roots. Results showed that GFLV was present in a 12,8% of samples with a 31% correlation of virus/vector.

La degeneración infecciosa de la vid o "grapevine fanleaf virus" (GFLV) es la virosis más importante en los viñedos de todo el mundo y la mejor conocida en sus facetas física, química y biológica. Se caracteriza por una amplia gama de síntomas, mosaico amarillo (yellow mosaic), "bandeado en venas" (vein banding) y "hoja en abanico" (fanleaf), que realmente son variantes biológicas de parentesco serológico muy próximo (Hewitt *et al.*, 1970 y Smith *et al.*, 1988), que pueden inducir a errores en diagnósticos visuales (Fresno, 1992 y Golino *et al.*, 1992). Es un Nepovirus que se transmite principalmente por el nematodo ectoparásito *Xiphinema index* Thorne *et Allen* (Hewitt *et al.*, 1958), que tiene una capacidad de movimiento muy baja, de 1,5 m/año, siendo, por lo tanto el material de propagación infectado el principal causante de la dispersión.

Las primeras citas sobre la degeneración infecciosa de la vid en España corresponden a de Bodadilla (1948), pero es a partir de 1970 cuando aparecen los primeros trabajos sobre el virus del "entrenado corto" en nuestros viñedos, (Fresno, 1992). Peña-Iglesias (1989) afirma que el virus se encuentra distribuido por toda la geografía española con una incidencia en los viñedos próxima al 90%, porcentajes similares a los estimados por Pérez Camacho (1981), quien

lo cita en los viñedos de la Denominación de Origen de Montilla (Córdoba). Fresno *et al.* (1992), Arias y Fresno (1993) y Golino *et al.* (1992) demuestran la baja correlación entre sintomatología y virosis y por lo tanto la poca fiabilidad de los diagnósticos visuales e indican la importancia de utilizar métodos de diagnóstico serológicos en prospecciones y programas de indexaje, recomendando la técnica de ELISA (Clark y Adams, 1977). Su nematodo vector, *X. index*, ampliamente distribuido en nuestros viñedos (Arias *et al.*, 1985), se encuentra condicionado por los factores ambientales (Arias y Fresno, 1993).

La superficie dedicada a viñedo en la Comunidad de Castilla León, según los datos del anuario Estadístico de esta comunidad (1989), asciende a 71.457 ha, de ellas 28.500 ha se encuentran en zonas con denominación de origen, estando inscritas en los Consejos Reguladores el 30,7%. En la Comunidad Autónoma existen trece comarcas vitivinícolas, correspondientes a las denominaciones de origen de El Bierzo, Cebreros, Cigales, Ribera de Duero, Rueda y Toro (Fig. 1).

En 1988 se inició una campaña fitosanitaria con el propósito de evaluar el estado sanitario del viñedo en Castilla León respecto a enfermedades víricas, realizándose un muestreo previo al azar (García-Benavides y López-Robles,

1992). Posteriormente, durante los años 1989 y 1990 se realizaron campañas de muestreo en las que técnicos y agricultores colaboraron en una prospección al azar en las comarcas de la Comunidad de Castilla-León, con Denominaciones de Origen, a fin de comprobar la presencia de virus y su correlación con los nematodos vectores en los viñedos.

Material y métodos

Se han estudiado un total de 4.934 muestras de material vegetal, compuestas cada una por cuatro brotes jóvenes de cepas elegidas de las distintas variedades, en cantidad proporcional a la superficie dedicada en cada comarca de Denominación de Origen (D.O.), cada muestra venía acompañada de una ficha de campo, donde se reflejaban sus características principales (portainjerto, variedad, localidad, observaciones sintomatológicas, etc.), indicándose asimismo el lugar de la toma mediante un croquis, al objeto de tenerla localizada para una posterior toma de muestra de suelo para su análisis nematológico, en el caso de resultar positiva de virosis. Del mismo modo se estudiaron 110 muestras de suelo.

El diagnóstico inmunoenzimático para la detección del virus se realizó mediante la técnica ELISA-DAS, Clark y Adams (1977), utilizando antisueros comerciales BIOREBA contra GFLV y tampones de extracción con nicotina o TRIS-CLH 0,5M. Se consideraron positivos los valores dobles de la media de los testigos negativos. Como controles positivos se utilizaron muestras cuyo diagnóstico fue confirmado en los laboratorios de virología del CIT-INIA de Madrid y el CRIA de Murcia.

Una vez comprobada la presencia de GFLV, de las cepas afectadas se tomaron muestras de suelo durante el año 1989, a fin de comprobar la presencia de nematodos vec-

tores. La toma se realizó a dos profundidades, 1-15 cm y 16-50 cm. La extracción de nematodos se llevó a cabo mediante la técnica de Flegg (1967).

Resultados y discusión

De las 4.934 muestras estudiadas en el conjunto de los tres años 633 resultaron positivas de GFLV, es decir el 12,8%. De las 1.240 muestras estudiadas el primer año, resultaron positivas para GFLV 164 (13,2%), de las 1.754 del segundo, 207 (11,9%), y de las 1.940 del tercero lo fueron 263 (13,5%), que representa un 12,8% de muestras y un 21,2% de parcelas infectadas respecto al total de las estudiadas. Resultados similares a los obtenidos por Fresno *et al.* (1993) para Galicia, Fresno (1992) para Castilla-La Mancha, y Arias *et al.* (1993) para Canarias y en contraposición con los de Peña Iglesias (1989) y Pérez Camacho (1981). Estos resultados confirman la necesidad de utilizar estos métodos serológicos en estudios de campo (Fresno *et al.*, 1992; Arias y Fresno, 1993; Fresno y Arias, 1993).

Por otro lado, tanto el virus como su nematodo vector se encuentran ampliamente distribuidos en Castilla-León (Fig. 1). En la Tabla I figuran los resultados del test inmuno-enzimático de las muestras estudiadas, en ella se indican, por orden alfabético, las denominaciones de origen, el número de muestras analizadas en cada una, el número de muestras afectadas por virosis y sus porcentajes, así como el porcentaje de muestras de suelo, de la zona perirradicular de plantas positivas de GFLV, en que apareció *X. index*.

Se observa que El Bierzo es la D.O. menos afectada por la virosis, resultaron positivas entre un 2,5% del total de muestras en 1989 y un 3% de las de 1990 y un 2,8% y 8% de las parcelas en ambos años respectivamente, solamente 6 de los 29 municipios muestreados en 1989 y 10 de los 24 de 1990 resultaron positivos.

TABLA Muestras analizadas y positivas para GFLV en cada denominación de origen y en total.

Denominación de origen	Muestras analizadas	Muestras positivas para GFLV	% de infección	% presencia de <i>X. index</i> en plantas viróticas
BIERZO, EL	1326	39	2,9	-
CIBREROS	412	64	15,5	31
CIGALES	974	100	10,6	16,7
RIBERA DEL DUERO	635	87	13,7	50
RUEDA	1251	223	18,4	-
TORO	399	120	30,0	50
TOTAL	4934		12,8	31

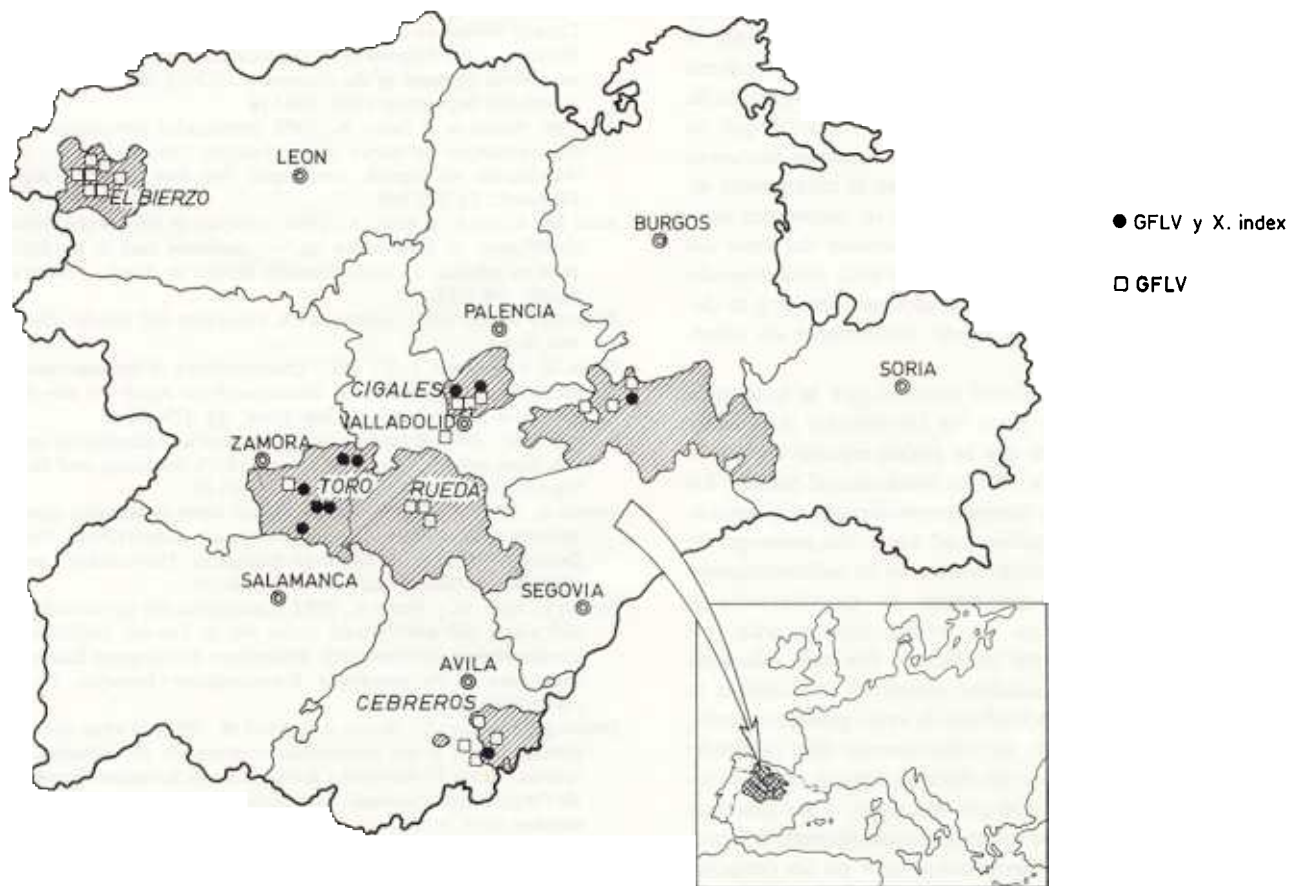


Fig. 1 - Distribución de GFLV y *Xiphinema index* en las distintas Denominaciones de Origen de Castilla-León.

Por el contrario, la más afectada parece ser la D.O. Toro, con un 48% de muestras y un 51% de parcelas infectadas en el muestreo de 1990, mientras que en 1989 fue de 18% en las muestras y 20% en las parcelas. El resto de las denominaciones de origen se sitúan entre el 9% y 19% de muestras positivas, estando las parcelas entre el 20% y el 50%. Así mismo cabe destacar que en las D.O. Cigales y Toro y en la D.E. Cebreros no se encontró ningún municipio libre de virus, en la D.O. Rueda tres y en D.O. Ribera de Duero aproximadamente el 50% de los municipios parecen estar libres de virus. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de muestras por parcela no es homogéneo en las distintas zonas.

La presencia del nematodo vector, en general, parece estar bastante relacionada con la existencia de virosis. Se observa, que de las 77 muestras de suelo estudiadas, de la zona perirradicular de plantas infectadas con GFLV pertenecientes a 27 comarcas de las distintas D.O. (16 de Cebreros, 12 de Cigales, 13 de El Bierzo, 2 de Ribera de Duero,

3 de Rueda, y 31 de Toro), solamente apareció *X. index* en 24 de ellas, es decir en el 31% del total de muestras; 16, el 50% de las muestras positivas de GFLV estudiadas de la D.O. de Toro, la que presenta el mayor porcentaje de virosis; 5 pertenecen a Cebreros (31%), 2 en Cigales (16,7%) y una en Ribera de Duero (50%), no apareciendo nematodos vectores en las D.O. de El Bierzo, donde el porcentaje de virosis es considerablemente inferior al de las restantes D.O. a pesar del considerable número de parcelas y muestras analizadas en esta zona, ni en la de Rueda a pesar del alto porcentaje de virosis detectadas.

Si bien hay que tener muy en cuenta que solamente se realizó el estudio nematológico en los muestreos del primer año, en una sola época del año, entre octubre y noviembre, y, en algunas zonas, con un número de muestras poco representativo. Por todo ello, debido a la distribución espacial de estos organismos a lo largo de las distintas estaciones del año de acuerdo con sus requerimientos ambientales (Arias y Fresno, 1993), consideramos

muy posible que la incidencia del nematodo vector sea superior a lo encontrado, por lo que sería conveniente la realización de muestreos más intensos, teniendo en cuenta la morfología del suelo y otros parámetros ambientales de las distintas zonas. Por otro lado, llama la atención que no haya aparecido *X. diversicaudatum*, nematodo frecuente en Europa y ampliamente distribuido en la mitad norte de la Península, ya que es un nematodo de ambientes templados (Arias *et al.*, 1985 y 1986), transmisor del virus del "mosaico del Arabis" (AMV), que está relacionado serológicamente y con una sintomatología similar a la debida al GFLV, con el que puede encontrarse en infecciones mixtas.

En consecuencia, podemos concluir que la incidencia del virus del entrenudo corto en los viñedos de Castilla León es muy inferior a lo que se podría esperar en base a diagnósticos visuales, por ello es fundamental realizar los diagnósticos por medios inmunoenzimáticos que permitan la detección real e inequívoca del virus. Sin embargo, la correlación con su nematodo vector es lo suficientemente elevada como para garantizar la persistencia y propagación del virus en estas zonas, aún en replantaciones con material certificado. Por todo ello sería conveniente realizar estudios dirigidos, no sólo a la detección del GFLV, sino también de otras posibles virosis, así como la necesidad de un conocimiento más profundo de los nematodos vectores en distintas épocas del año, teniendo en cuenta la morfología del suelo, y las prácticas agrícolas de la zona para un mejor conocimiento del problema que plantean y buscar soluciones en un contexto agroecológico.

Agradecimientos. Los autores agradecen, las sugerencias del Prof. A. Bello y Dr. J. M. Rey; al personal técnico de las Secciones de Agricultura de la Junta de Castilla y León por su colaboración en la toma de muestras, así como la ayuda técnica de Alicia Gala, Juan García Vaquero y Casimiro Martínez. El Proyecto se ha realizado en parte dentro del Proyecto PB89-0034, financiado por la CICYT.

Obras citadas

- ANONIMO, 1989. *Anuario Estadístico de Castilla y León*. Consejería de Economía y Hacienda. Servicio de Estudios: 660 pp.
- ARIAS M. y FRESNO J., 1993. Agroecological characterization of *Xiphinema index* Thorne et Allen in Spain. *Bull. EPPO*. (en prensa).
- ARIAS M., FRESNO J. y BELLO A., 1993. Grapevine Fanleaf Virus in Canary Island as a model for Mediterranean Region. *XIth Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG)*, Montreaux, Suiza, 6th-9th September 1993: 108-110.
- ARIAS M., NAVAS A. y BELLO A., 1985. Nematodos ectoparásitos y transmisores de virus de la familia Longidoridae. Su distribución en España continental. *Bol. Serv. Plagas e Insp. Fitopatol.*, 11: 377-380.
- ARIAS M., NAVAS A. y BELLO A., 1986. Analysis of the geographical distribution of *Xiphinema diversicaudatum* and *X. pachtaicum* in relation to environmental factors in Spain. *Nematol. medit.*, 14: 7-13.
- BOBADILLA G. de, 1948. Degeneración infecciosa del viñedo. *Siembra*, 4: 4-6.
- CLARK M. F. y ADAMS A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- FLEGG J. J. M., 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Ann. appl. Biol.*, 60: 420-437.
- FRESNO J., 1992. *Correlación bioecológica entre nematodos transmisores de virus y el virus del entrenudo corto (GFLV)*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 262 pp. (sin publicar).
- FRESNO J., ARIAS M. y BELLO A., 1992. Caracterización agroecológica del virus del entrenudo corto de la vid en ambientes mediterráneos continentales. *Resúmenes VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Torremolinos (España), 11-15 mayo 1992, p. 167.
- FRESNO J., CABALEIRO C., SEGURA A. y ARIAS M., 1993. El virus del entrenudo corto y sus nematodos vectores en los viñedos de Galicia. *Actas IV Reunión Científica de la Sociedad Española de Fitopatología*. Santiago de Compostela (España) 29-30 septiembre 1993, p. 50.
- GARCÍA-BENAVIDES P. y LÓPEZ-ROBLES J., 1992. Prospección del "Grapevine Fanleaf Virus (GFV)" y de los nematodos transmisores en los viñedos de Castilla y León. *Resúmenes IV Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Torremolinos (España) 11-15 mayo, p. 78.
- GOLINO D., VERDEGAL P., ROWHANI A. y WALKER A., 1992. Grapevine Nepoviruses in San Joaquin Country. *California Agric.*, 46: 11-13.
- HEWITT W. B., MARTELLI G., DIAS H. F. y DIAS, R. H., 1970. Grapevine fanleaf virus. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses*, n. 28: 4 pp.
- HEWITT W. B., RASKI D. J. y GOHEEN A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48: 586-595.
- PEÑA-IGLESIAS A., 1989. Virus and transmissible diseases of the grapevine. In: R. Cavallo (Ed.). *Plant protection problems and prospects of integrated control in viticulture*. Editorial European Communities, Luxembourg, pp. 459-470.
- PÉREZ CAMACHO F., 1981. Importancia y distribución de enfermedades de etiología supuestamente viral, en viñedos de la zona de denominación de origen "Montilla-Moriles". *An. INIA/Serv. Agric./N.* 15: 151-156.
- SMITH I. M., LELLIOT R. A. y ARCHER S. A., 1988. *Manual de enfermedades de las plantas* Ed. Mundi Prensas, 671 pp.