



## CAPÍTULO 9

# Vid

### Fitoplasmas

Gomez Talquenca, S. y L. Conci

238	<i>Introducción</i>
239	<i>Hospedantes</i>
239	<i>Sintomatología</i>
240	<i>Distribución en el mundo</i>
240	<i>Epidemiología</i>
241	<i>Manejo de la enfermedad</i>
241	<i>Monitoreos en el país</i>
242	<i>Bibliografía</i>

## Introducción

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular, de naturaleza parasítica y están restringidas a dos tipos de hospedantes: plantas e insectos. Se los ha encontrado infectando más de 1000 especies de plantas alrededor del mundo y son responsables de importantes pérdidas en diferentes cultivos (Hogenhout *et al.*, 2008). Aún no ha sido posible su cultivo *in vitro*, lo cual ha dificultado no solamente su estudio sino su taxonomía, por lo que de manera provisoria se describen como "*Candidatus Phytoplasma spp.*" (Gasparich, 2010). La amplificación de una porción del gen 16S ARN de los fitoplasmas, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), su posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP) y secuenciación, permitió sentar las bases de un sistema de clasificación. Posibilitó además realizar análisis filogenéticos entre los fitoplasmas y con otros grupos de bacterias, demostrándose que los primeros representan un clado monofilético de una sorprendente diversidad, dentro de la clase *Mollicutes* (Lee *et al.*, 2000). Son muy pequeños (0,2-0,3 micrones) viven exclusivamente en el floema de las plantas y en los insectos vectores. En la naturaleza se transmiten de manera persistente y propagativa mediante Cicadélidos, Delfácidos, Cixidos y Psílidos, conocidos como "*chicharritas*", cuando éstos se alimentan.

En la vid los fitoplasmas son considerados causantes de un conjunto de enfermedades llamadas genéricamente "Amarillos" (Grapevine Yellows, GY). Las enfermedades más importantes descritas en vid, son Flavescencia Dorada y Bois Noir (madera negra). Estas tienen una etiología y epidemiología distintivas, aunque son indistinguibles en base a los síntomas observados en las plantas afectadas. La primera enfermedad en ser registrada fue flavescencia dorada, en Francia, hacia la década de 1950 (Levadoux, 1955), desde donde se dispersó por diferentes regiones vitivinícolas de Europa. Si bien se la consideró en un principio como un problema fisiológico, rápidamente se determinó su naturaleza infecciosa, inicialmente se asumió que estaba causada por un virus. Actualmente está incorporada como enfermedad cuarentenaria en todas las áreas productoras de vid. Poco tiempo después se registró, también en Francia, la enfermedad llamada bois noir, la cual presentaba sintomatología similar a flavescencia dorada, pero fue considerada una enfermedad distinta porque se estableció que el vector era diferente (Belli *et al.*, 2010). Desde el establecimiento de la existencia de este tipo de patógenos en el año 1967 (Doi *et al.*, 1967), otras enfermedades asociadas con la presencia de fitoplasmas y con síntomas similares a flavescencia dorada y bois noir han sido descritas en cultivos de vid de todo el mundo (Tabla 10.1).

**Tabla 10.1.** Enfermedades causadas por fitoplasmas en cultivos de vid de diferentes regiones productoras, teniendo en cuenta el agente causal, el grupo al cual pertenece, el insecto vector y la distribución geográfica (Belli *et al.*, 2010).

Enfermedad	Grupo 16Sr	Agente causal	Insectos vectores	Distribución geográfica
Flavescencia dorada	16Sr V	<i>Candidatus Phytoplasma vitis</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Francia, Italia, España, Portugal, Serbia, Eslovenia, Suiza
Bois noir	16SrXII	Ca <i>P. solani</i>	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	Europa, Israel, Chile
Palatinate grapevine yellows	16SrV	Ca <i>P. ulmi</i>	<i>Oncopsis alni</i>	Alemania
Virginian grapevine yellows	16Sr III	Ca <i>P. pruni</i>		EEUU
Australian grapevine yellows	16Sr XIII	Ca <i>P. australiense</i>		Australia
Australian grapevine yellows	16Sr II	Ca <i>P. australasia</i>		Australia
Auckland valley grapevine yellows	16Sr I	Ca <i>P. asteris</i>		Australia, Chile
Amarillamiento de la vid	16Sr VII	Ca <i>P. fraxini</i>		Chile

## Hospedantes

Los amarillamientos de la vid pueden estar asociados a la presencia de diferentes fitoplasmas, por lo que también es variable el rango de hospedantes que pueden poseer tanto el patógeno como el vector. El sistema de clasificación actual de fitoplasmas se define en base al análisis de secuencia del gen 16S ARNr (Lee *et al.*, 1993; 1998), habiéndose establecido hasta el presente 28 grupos 16Sr y más de 50 subgrupos. Para una mejor diferenciación dentro de los distintos grupos, se puede recurrir al análisis de otros genes con secuencias variables flavescencia dorada está causada por fitoplasmas del grupo “Elm yellows” (16Srv). El principal hospedante de este fitoplasma es *Vitis vinifera*, aunque se han registrado infecciones naturales de *V. riparia*. Se ha logrado transmisión experimental a *Vicia faba* y a *Chrysanthemum carinatum*. Sin embargo, se considera que el único hospedante de significancia para la flavescencia dorada es *V. vinifera*. Recientemente se ha reportado la presencia del fitoplasma asociado a flavescencia dorada en hospedantes leñosos colindantes con viñedos infectados (Borgo *et al.*, 2008).

El bois noir, en cambio, está causada por un fitoplasma del grupo “Stolbur” (16Srxii subgrupo A). Los fitoplasmas de este grupo tienen un rango de hospedantes extremadamente amplio, por lo que es importante distinguir entre especies infectadas ocasionalmente y aquellas que son hospedantes principales y con importancia epidemiológica. Los hospedantes más importantes de este grupo de fitoplasma en Europa son dos malezas: Correhuela (*Convolvulus arvensis* L.) y Ortiga (*Urtica dioica* L.), las cuales tienen importancia diferente en cada región. Otros hospedantes herbáceos pueden ser considerados importantes, pero dado el ciclo biológico del vector, epidemiológicamente son más significativas las plantas perennes que las anuales (Maixner, 2011).

## Sintomatología

Los síntomas de las distintas enfermedades causadas por fitoplasmas en vid son prácticamente idénticos, lo que hace imposible su identificación solamente en base a la sintomatología. El primer indicio de la enfermedad es la brotación irregular, observándose un retraso en las plantas afectadas. Los síntomas presentados por plantas infectadas son claros, aunque en algunas situaciones pueden confundirse con alteraciones fisiológicas o problemas causados por otros patógenos. En hojas se produce una clorosis difusa marcada en variedades blancas, mientras que en variedades tintas se producen coloraciones rojizas-violáceas (Foto 116), en algunos casos delimitados por las nervaduras. En variedades blancas las nervaduras toman un aspecto clorótico y en las variedades tintas pueden terminar necrosándose. En todos los casos las hojas se enrollan marcadamente hacia el envés. En las variedades blancas, las hojas con los síntomas descriptos adicionalmente presentan un brillo particular, como si estuvieran recubiertas por una capa cerosa (Foto 117). Los brotes presentan un acortamiento irregular, entrenudos cortos y en zig-zag (Foto 118), no toman rigidez, presentando el aspecto de un brote de goma. En algunos casos se presentan puntuaciones negras sobre el brote no lignificado (Foto 119). Los brotes que no han lignificado adecuadamente pueden necrosarse ante las primeras heladas invernales, dando el nombre de madera negra. En los racimos se observa frecuentemente una necrosis parcial del raquis ya desde el momento de floración (Foto 120). Las plantas afectadas pueden presentar la sintomatología en la totalidad de la planta, o incluso en un solo brote, siendo esto último, reflejo en algunos casos de una infección reciente o bien de una distribución irregular del patógeno en la planta. Los daños son principalmente por una disminución en el volumen de cosecha debido a la necrosis parcial de racimos, disminución de la carga por el declinamiento progresivo de las plantas y menor calidad de la uva. También puede considerarse como un perjuicio económico la mala calidad de la madera cuando se persigue la producción de material de propagación.

No hay cultivares de vid resistentes a los amarillamientos, pero si hay una marcada susceptibilidad varietal. Variedades como Chardonnay, Alicant Bouschet, Garnacha y Tannat son muy sensibles, mientras que Merlot, Syrah y Sauvignon Blanc son menos susceptibles. Si bien no es frecuente, se ha reportado remisión de síntomas en casos donde no hubo posibilidad de reinfección por vectores. Esto es más notable en algunas variedades, como por ejemplo, Barbera (Belli *et al.*, 1978) En algunos casos la remisión de síntomas se ve acompañada por una desaparición del patógeno en la planta y ya ha sido demostrada en otras especies de gran importancia económica como duraznero y manzano, infectadas por fitoplasmas (Zorloni *et al.*, 2008). Los portainjertos generalmente no presentan síntomas cuando están infectados, pero si los podrían manifestar los materiales sobre ellos injertados.

### Distribución en el mundo

Bois noir y flavescencia dorada han sido descritas principalmente en los países mediterráneos y de Europa central. Flavescencia dorada tiene una distribución más limitada (Francia, España, Portugal, Suiza y Norte de Italia), mientras que bois noir está ampliamente diseminada en Europa (Francia, Alemania, Italia, Suiza, España, Turquía, Serbia, Ucrania) y el resto del mundo (Israel, Líbano). Se han reportado amarillamientos de vid asociados a fitoplasmas del grupo Stolbur u otros grupos en Irán, China, Croacia, Chile, Estados Unidos, Bulgaria, Grecia, Túnez, Sudáfrica, México, Australia y Nueva Zelanda. En viñedos de Chile se han identificado plantas con síntomas de amarillamiento causados por fitoplasmas los que de acuerdo al análisis del gen 16sr fueron identificados miembros de los grupos 16srI (Aster Yellows) (*Candidatus Phytoplasma asteris*), 16srVII (*Ca. P. fraxini*) y 16srXII (stolbur or "bois noir") (Gajardo *et al.*, 2009). La incidencia de estos patógenos en el cultivo dependerá de la propagación de plantas infectadas y de las especies de insectos que podrían funcionar como vectores de la enfermedad en la región, alimentándose de

vid o bien de malezas circundantes (Longone *et al.*, 2011) (Tabla 10.1).

### Epidemiología

La epidemiología de los amarillamientos de la vid es bastante compleja. Al estar causadas por distintos fitoplasmas, sus características son diferentes, por lo que en cada patosistema se deben estudiar los diferentes componentes de la enfermedad con la finalidad de plantear estrategias eficientes de control. Sin embargo, al ser patógenos transmitidos por injerto, comparten una característica común y también con las enfermedades causadas por virus, que es el hombre a través de la comercialización de material de propagación infectado, el principal diseminador de estas enfermedades a larga distancia. Sin la intervención del hombre los fitoplasmas son exclusivamente transmitidos por chicharritas en forma persistente propagativa.

El fitoplasma asociado a flavescencia dorada es transmitido por *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) oriundo de América del Norte e introducido en Europa accidentalmente. Si bien este cicadélido ha sido reportado colonizando distintas especies leñosas salvajes y cultivadas en América del Norte, en Europa esta solamente restringida a la vid. Ha sido detectado en la maleza *Clematis vitalba* L., aunque sin desarrollo de síntomas, por lo que sólo ocasionalmente se ha registrado la presencia del fitoplasma en esta especie. También se ha reportado la presencia de este fitoplasma en *Ailanthus altissima* L., sin embargo la significancia epidemiológica debe ser clarificada. Hasta el momento, se considera que todo el ciclo epidemiológico de la enfermedad se desarrolla entre la planta de vid y el vector. Este insecto en las condiciones del sudeste francés tiene una generación por año. Presenta un período de adquisición de 7-8 días, seguido de un periodo de latencia relativamente largo (cerca de un mes). Tanto los estadios ninfales como los adultos son capaces de adquirir el fitoplasma, pero los machos son más eficientes transmisores que las hembras. La capacidad de transmitir una vez adquirido el fitoplasma persiste por toda la vida del insecto.

## Manejo de la enfermedad

Como todas las enfermedades transmitidas por multiplicación agámica e injerto, el primer y más eficiente método de control, es el uso de material de propagación de calidad certificada. En la Argentina hay un programa de producción de material de propagación libre de virus, pero al ser los fitoplasmas organismos cuarentenarios para nuestro país, no se contempla su análisis. El ingreso de material de propagación del exterior está regulado y controlado por SENASA. Actualmente se permite el ingreso de material de propagación de categoría certificado desde países que puedan presentar un riesgo (Francia e Italia), sin embargo los controles tanto en los países de origen (Angelini *et al.*, 2011) como en Argentina han sido exitosos hasta el momento, dado que no se han registrado reportes de infección en país.

Dada las diferencias epidemiológicas ya descritas entre flavesencia dorada y bois noir, el manejo a campo de ambas tiene notables diferencias en la metodología y la eficiencia. En el caso de flavesencia dorada, el control químico de *S. titaneus* con remoción de plantas afectadas y reemplazo por plantas sanas, es un método efectivo de manejo. En el norte de Italia se implementan medidas de este tipo en forma sistemática, combinadas con barreras sanitarias, con buenos resultados para evitar la diseminación de la enfermedad. Por otra parte las medidas de erradicación de viñedos abandonados o aquellos con manejo sanitario deficiente, ha dado resultados satisfactorios en la disminución del impacto de la enfermedad (Belli *et al.*, 2010).

Por otra parte, el manejo de bois noir es mucho más complejo. Tratamientos insecticidas contra *H. obsoletus* han demostrado no ser eficientes en la disminución de los insectos presentes en viñedos (Mori *et al.*, 2008). Asimismo, tratamientos tardíos con herbicidas sistémicos en malezas hospederas ha tenido poco éxito en disminuir el número de adultos emergentes en la temporada siguiente (Kehrli & Delabays, 2011). Sin embargo, el manejo de malezas hospedantes, del fitoplasma y del vector, serían el principal método de control

en zonas donde ya se ha constatado la presencia de esta enfermedad. Dada la posibilidad de nuevas especies vectoras del fitoplasma asociado a bois noir, en muchos países se conducen estudios tendientes a identificar potenciales vectores, con el objeto de desarrollar estrategias de manejo ante la eventual ocurrencia de la enfermedad (Maixner, 2011).

## Monitoreos en el país

En la Argentina se han conducido relevamientos en viñedos añosos como así también en implantados recientemente con material de propagación oriundo de las regiones donde estas enfermedades son endémicas. Si bien se han observado plantas con sintomatología similar a la descrita, los análisis de laboratorio realizados sobre los materiales colectados han resultado negativos a la infección con fitoplasmas. Asimismo, muchos de estos materiales presentaron infección con virus asociados a la enfermedad “Enrollado de la hoja” o “Degeneración infecciosa”, que pueden presentar sintomatología similar a la descrita para fitoplasmas.

Argentina no está exenta de la presencia de fitoplasmas afectando diferentes cultivos, plantas ornamentales, nativas y malezas. Se han reportado en el país más de 20 especies de plantas infectadas con fitoplasmas. Algunas de ellas, cultivos de gran importancia económica como ajo (*Allium sativum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch), maíz (*Zea mays* L.) y paraíso (*Melia azedarach* L.) entre otros, produciendo daños y pérdidas variables (Conci *et al.*, 2005; Arneodo *et al.*, 2007; Galdeano *et al.*, 2009). Se tiene escasa información con respecto a los vectores involucrados en cada caso y tampoco hay datos acerca de la fisiopatología de estas enfermedades. Estos patógenos podrían, existiendo el vector adecuado, infectar otros cultivos como la vid, o bien podrían diseminar patógenos que ingresen con el material biológico en procesos de importación.

## Bibliografía

- ANGELINI, E.; BAZZO, I.; BELLOTTO, D.; BERTAZZON, N.; BORGIO, M.; DALLA CIA, L.; FILIPPIN, L.; FORTE, V.; PATRIARCA, E.; PERINI, G.; RAINATO, A. and L. STRINGHER. 2011. Occurrence of Bois noir in nurseries and young vineyards. 2<sup>nd</sup> European Bois noir Workshop, Castelbrando, Cison di Valmarino, Italy 51-52.
- ARNEODO, J.; MARINI, D.; GALDEANO, E.; MENEGUZZI, N.; BACCI JR., M.; DOMEQ, C.; NOME, S. and L. CONCI. 2007. Diversity and Geographical Distribution of Phytoplasmas infecting China-tree in Argentina. *Journal of Phytopatology* 155; 70-75.
- BELLI, G.; FORTUSINI, A. and R. OSLER. 1978. Present knowledge on diseases of the type "Flavescence dorée" in vineyards of Northern Italy. In Proceedings of the 6<sup>th</sup> Meeting of ICV.G. Cordoba, España.
- BELLI, G.; BIANCO, P.A. and M. CONTI. 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology*. 92(2): p. 303-326.
- BORGIO, M.; ALBANESE, G.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; ERMACORA, P.; FERRETTI, L.; FERRINI, F.; FILIPPIN, L.; PASQUINI, G. and E. ANGELINI. 2008. Ruolo di altre piante nell'epidemiologia dei fitoplasmi agenti di Flavescenza dorata e Legno nero. *Petria*. 18: p. 261-263.
- CONCI, L.; MENEGUZZI, N.; GALDEANO, E.; TORRES, L.; NOME, C. and S. NOME. 2005. Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group (*Candidatus Phytoplasma fraxini*). *European Journal of Plant Pathology* 113:255-265.
- DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K. and H. ASUYAMA. 1967. "Mycoplasma or PLT-group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom". *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33 (4): 259-266.
- GAJARDO, A.; FIORE, N.; PRODAN, S.; PALTRINIERI, S.; BOTTI, S.; PINO, A. M.; ZAMORANO, A.; MONTEALEGRE, J. and BERTACCINI, A. 2009. Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. *Plant Disease*, 93: 789-796.
- GALDEANO, E.; CONCI, L.; GONZÁLEZ, O.; PARADELL, S.; DI RIENZO, J.; NOME, C. and V. CONCI. 2009. Epidemiological aspects of garlic decline disease caused by a phytoplasma in Asiatic and Argentinean garlic cultivars. *Australasian Plant Pathology* 38: 437-443.

- GASPARICH, G.E. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals* 38: 193-203.
- HOGENHOUT, S.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H. and S. NAMBA 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9(4):403-423.
- KEHRLI, P. and N. DELABAYS. 2011. Controlling 'bois noir' disease on grapevine: does the timing of herbicide application affect vector emergence? *Journal of Applied Entomology* 136(3): p. 234-237.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E. and D.E. GUNDERSEN-RINDAL. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E. and I.M. BARTOSZYK. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- LEE, I.M.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. and D.E. GUNDERSEN. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of MLO's. *Phytopathology* 83: 834-842.
- LEVADOUX, L. 1955. L'état sanitaire et la sélection du Baco 22A. *Agriculture* 18: p. 257-259.
- LONGONE, V.; GONZÁLEZ, F.; ZAMORANO, A.; PINO, A.M.; ARAYA, J.; DÍAZ, V.; PALTRINIERI, S.; CALARI, A.; BERTACCINI, A.; PICCIAU, L.; ALMA, A. and N. FIORE. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): s91-s92 ISSN 1721-8861.
- MAIXNER, M. 2011. Recent advances in Bois noir research. *In: Angelini E. (ed.), Book of Abstracts 2<sup>nd</sup> European Bois Noir Workshop. Castelobrandino, Cizin di Valmarino, Italy: 17-32.*
- MORI, N.; PAVAN, F.; BONDAVALLI, R.; REGGIANI, N.; PALTRINIERI, S. and A. BERTACCINI. 2008. Factors Affecting The Spread Of "Bois Noir" Disease In North Italy vineyards. *Vitis* 47(1): p. 65-72.
- ZORLONI, A.; CASATI, P.; QUAGLINO, F.; BULGARI, D. and P.A. BIANCO. 2008. Incidenza del fenomeno del "recovery" in vigneti della Lombardia. *Petria* 18: p. 388-390.