

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

SANEAMIENTO DE LA VID CV. RED GLOBE DEL VIRUS ASOCIADO A LA LESIÓN DEL PATRÓN DE UVA DE MESA (*GRSLaV*) MEDIANTE TERMOTERAPIA Y CULTIVO DE TEJIDOS.

Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo
Mención: Fruticultura

ALEJANDRO ERNESTO CAMACHO GONZÁLEZ

PROFESOR GUÍA	CALIFICACIONES
Sr. Rodrigo Infante E. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6.5
 PROFESORES CONSEJEROS	
Sr. Jaime Montealegre A. Ingeniero Agrónomo	7.0
Sra. Loreto Prat Del R. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	5.5

SANTIAGO-CHILE, 2005

ÍNDICE

SANEAMIENTO DE LA VID CV. RED GLOBE DEL VIRUS ASOCIADO A LA LESIÓN DEL PATRÓN DE UVA DE MESA (*Grapevine Rootstock Stem Lesion associated Virus*) MEDIANTE TERMOTERAPIA Y CULTIVO DE TEJIDOS.

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Materiales	7
Métodos	7
Diseño experimental y análisis estadístico	8
RESULTADOS Y DISCUSION	9
CONCLUSIONES	15
BIBLIOGRAFÍA	16

A mis padres por su apoyo y confianza constante....a mi abuela Sylvia.....a Camila

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a aquellas personas que de alguna manera cooperaron con el desarrollo de esta memoria.

A mi profesor guía Rodrigo Infante por tener la paciencia y la voluntad de guiarme en todo momento en el desarrollo de esta memoria.

A mis profesores consejeros Jaime Montealegre y Loreto Prat por su buena disposición y ayuda para guiarme.

Al profesor Alberto Mansilla por su excelente disposición, calidad humana y profesional en la parte estadística.

A la gente del Laboratorio de Certificación Frutal, Simona Prodan, Carlos Valdivia, Enzo Traficante, Mauricio Estrada y Nicola Fiore, por su incondicional apoyo en los trabajos en terreno y laboratorio.

A mi amiga Carolina Kusch, por su valorable cooperación en el formato de esta memoria.

A mi amiga Camila Tapia por su grandísimo aporte y colaboración en la parte matemática.

A mis amigos, Franz Kraemer y Andrés Baeza, por su desinteresado e irrestricto apoyo durante esta memoria y en la vida en general.....

A mis padres, familia y amigos en general por su apoyo y confianza infinita.

A la parafernalia completa.....

A la Universidad y la vida universitaria.....

RESUMEN

Se realizó un estudio preliminar para determinar el efecto combinado de la termoterapia y el cultivo de tejidos in vitro sobre vid variedad “Red Globe” infectada con el *Grapevine Rootstock Stem Lesion associated Virus* (GRSLaV). Cinco plantas de “Red Globe” provenientes de una planta madre positiva a GRSLaV, verificado a través de RT-PCR se sometieron a 0; 20; 40; 60; 80 y 100 días a 38 °C y 75% de humedad relativa. En cada período se extrajeron brotes provenientes de los crecimientos nuevos. De los brotes nuevos se usaron las yemas apicales y se establecieron in vitro. Posteriormente se transfirieron a un medio de enraizamiento, y se aclimataron en invernadero.

Se obtuvieron 10 plantas aclimatadas por cada período y cuando se lignificó el tallo, se sometieron a una prueba de DAS-ELISA y aquellas que resultaron negativas fueron sometidas posteriormente a una prueba de RT-PCR.

El mayor crecimiento de brotes nuevos de las plantas dentro de la cámara de termoterapia se obtuvo a los 60 días, creciendo fuertemente desde los 20 días. Después de este máximo crecimiento, las plantas comenzaron a decaer hacia los tratamientos térmicos 80 y 100 días.

A los 20 días de tratamiento se obtuvo un 10% de plantas libres de GRSLaV y a los 40 días, 60%. Todos los demás períodos no produjeron plantas sanas. Este resultado deja de manifiesto que no sólo la exposición a las altas temperaturas son efectivas para la obtención de plantas libres de GRSLaV, sino que también lo es la velocidad de crecimiento de los nuevos brotes. Se demuestra que la combinación de termoterapia con cultivo de tejidos es una herramienta capaz de generar plantas libres de este nuevo patógeno que afecta las vides en Chile.

Palabras clave: Termoterapia, plantas libres de virus, termotratamientos.

ABSTRACT

A preliminary study was conducted to determine the combined effect of thermotherapy and the culture of *in vitro* tissues upon the Red Globe grape variety infected with the Grapevine Rootstock Stem Lesion associated Virus (GRSLaV). Five Red Globe plants, coming from a positive mother plant to GRSLaV verified by means of RT-PCR were submitted to 0; 20; 40; 60; 80 and 100 days at 38°C and 75% of humidity. In each period shoots were extracted coming from the new growths. The apical buds of the new shoots were used and established *in vitro*. They were later transferred to a rooting medium and acclimated in a greenhouse.

Ten acclimated plants were obtained for each period and when the stem was lignified, they were submitted to a DAS-ELISA test. The ones that proved to be negative were later submitted to a RT-PCR test.

The best growth of new shoots inside the thermotherapy chamber was obtained after 60 days; the growth was easily noticeable from day 20 on. After this maximum growth, plants began to fade towards 80 and 100 days heat treatment.

After 20 days of thermotherapy a 10% of plants free from GRSLaV was obtained and 60% after 40 days. All the other periods did not produce healthy plants. This result shows that not only the exposure to high temperatures is effective to obtain plants free from GRSLaV, but also is speed of growth of the new shoots. Thus it becomes evident that the combination of thermotherapy with tissue culture is an effective tool which is able to generate plants that are free from this new pathogen that affects grapes in Chile.

Key words: Thermotherapy, free virus plants, thermotreatments.

INTRODUCCION

Se han identificado 55 virus que afectan a la vid, sin embargo, sólo algunos de ellos tienen importancia económica (Herrera y Madariaga, 2001). Los efectos adversos de los virus van desde retrasos en la madurez y disminución de los azúcares, color de la baya y rendimiento, hasta malformaciones foliares, problemas de cuaja, incompatibilidad entre patrón e injerto e incluso pérdidas totales de la producción (Pérez *et al.*, 2000).

La propagación clonal, el uso de variedades y patrones potencialmente infectados y el intercambio indiscriminado de materiales vegetales son la fuente más importante de diseminación de los virus en vid (Juárez *et al.*, 1988).

La uva de mesa en Chile históricamente se ha autoreproducido por estacas sin patrones debido a la ausencia de filoxera. Dado que las producciones y superficies han aumentado, paralelamente también han aumentado poblaciones de nemátodos y la replantación se ha convertido en un problema. Como resultado de esta situación, los productores han recurrido al uso de plantas injertadas. Desde 2002-2003, la variedad “Thompson Seedless” se ha injertado en patrones resistentes a nemátodos como “Harmony” y “Freedom, la cual ha mostrado severos síntomas de declinación. Las pruebas de virus en vides sintomáticas en estos parrones, usando una combinación de pruebas de ELISA y PCR, ha relevado altos rangos de infección con GLRaV-2 y GFkV. Los síntomas son aún más severos cuando las plantas se injertan en “Freedom” y “Harmony”, que cuando son autoenraizados (Golino, 2003).

Los métodos utilizados para eliminar los virus en las plantas son la termoterapia y el cultivo de meristemas. La termoterapia consiste en mantener plantas a una temperatura que inactiva al virus de manera que el tejido nuevo queda libre del agente causal de la enfermedad (Arancibia, 1986). Las plantas pueden sobrevivir a temperaturas más altas que los virus; si se mantienen a temperaturas entre 35-45°C por períodos determinados, los virus no se multiplican, mientras que las plantas sobreviven (Converse, 1994). Las plantas producen tejidos libres de virus, y estos pueden ser extraídos y aislados (Luppichini, 2000).

La termoterapia permite la aceleración de los procesos para obtener plantas sanas, debido a que los tratamientos se pueden realizar durante todo el año y muchas plantas pueden ser tratadas al mismo tiempo, así se incrementan las oportunidades de sobrevivencia de clones sanos (Gella *et al.*, 1998).

Por su parte, el meristema no posee elementos vasculares desarrollados y se dificulta el transporte de partículas virales. Además, los meristemas poseen una alta capacidad de división, que va en detrimento de la multiplicación del virus, produciendo una dilución de éste en la planta (Luppichini, 2000).

El cultivo de meristemas ha sido ampliamente utilizado para eliminar virus de la vid dentro de programas de certificación. Mientras más pequeño es el tamaño del explante, mayor es la posibilidad de eliminación de patógenos. Si se usa en combinación con la termoterapia o quimioterapia, puede aumentarse la posibilidad de producir plantas libres de virus (Castillo, 2001).

Así es como el conocimiento y desarrollo en estas técnicas *in vitro* ha permitido en vid la regeneración de plantas a partir de meristemas en forma rápida y masiva, la obtención de plantas libres de patógenos y la conservación de genotipos de alto valor comercial, ya que es una especie de fácil propagación, que puede ser propagada sin problemas *in vitro* (Castillo, 2001).

El saneamiento se vuelve esencial cuando no existen plantas libres de virus disponibles naturalmente o cuando biotipos cualitativamente muy buenos resultan infectados (Mannini *et al.*, 1998).

El GRSLaV pertenece a los closterovirus, produce decaimiento y muerte de plantas jóvenes de la variedad “Red Globe” por la inducción de la incompatibilidad entre el patrón y el injerto, observándose síntomas en patrones específicos. El síntoma característico es un engrosamiento en la zona de injerto, acompañado de necrosis y grietas irregulares (Uyemoto *et al.*, 2000).

Uyemoto *et al.* (2001) concluyeron que la incompatibilidad no es probablemente debido a factores genéticos sino que más bien al uso de material de injerto infectado, ya sea con virus, viroides o *Agrobacterium vitis*.

El GRSLaV fue detectado mediante análisis serológicos y moleculares en distintas variedades de vid en parronales de Italia, Grecia, Francia y Brasil entre los años 2001-2002 (Angelini *et al.*, 2004).

Dependiendo del color de la fruta, los síntomas de incompatibilidad patrón-injerto se manifiestan en el amarillamiento o enrojecimiento del follaje en variedades blancas o rojas respectivamente, hojas moteadas, márgenes de hojas enrolladas, débil a moderado crecimiento de brotes, y un sobre crecimiento en la unión del injerto. Las plantas debilitadas pueden sobrevivir poco tiempo, pero usualmente declinan rápidamente y mueren en dos años (Uyemoto y Rowhani., 2003).

El GRSLaV tiene un 74% de secuencias homólogas con la del virus GLRaV-2, sin embargo, en ensayos sobre vides no ha producido ningún síntoma típico de infección de hoja enrollada. Los resultados sugirieron que este nuevo closterovirus fue diferente a otros de su misma familia asociados con enfermedades de hoja enrollada de la vid (Rowhani *et al.*, 2002).

Se plantea que el crecimiento de brotes dentro de la cámara de termoterapia y el tratamiento con alta temperatura por distintos tiempos a plantas de vid var. "Red Globe" infectadas con GRSLaV y posterior cultivo in vitro de yemas apicales, permitiría obtener material de propagación sano.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se utilizaron cinco plantas de vid variedad “Red Globe” provenientes de una planta madre injertada sobre patrón “Harmony” infectada con GRSLaV, verificado por RT-PCR. La planta fue obtenida el año 2000 desde parronales comerciales de la Provincia de Melipilla (RM). Esta planta se ha mantenido en un macetero de 20 litros protegida con malla antiáfidos en la colección de virus, del Laboratorio de Certificación de Plantas de la Universidad de Chile. Se propagó por estacas y se obtuvieron las 5 plantas utilizadas en este trabajo, mantenidas también en maceteros de 20 litros.

Las plantas se colocaron en una cámara de termoterapia desde marzo hasta junio de 2004. La cámara tiene un volumen de 18 m³ con paredes aislantes y acondicionada con un calefactor óleo eléctrico de 1.000 W regulada a 38°C constante, a través de un termostato provisto de sensor de mercurio (Hanna, Londres, Inglaterra). Se mantuvo la humedad relativa cercana a 70-80%, medida con un higrómetro Leaf wetness recorder (Kahlsico, Los Ángeles, EEUU). Se mantuvo un régimen lumínico con 30 tubos fluorescentes con una potencia de 40 W cada uno, con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ a la altura del follaje y fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

A las plantas se les aplicó fertilizante de entrega lenta Osmocote una vez al año (100g/contenedor) con 18% N, 6% P, 12% K y fertilizante foliar como Profert (2mL/L) con 6% N, 3% P, 5% K, cada quince días los primeros tres meses.

Métodos

Las plantas se mantuvieron por 100 días en cámara de termoterapia y cada 20 días se extrajeron yemas apicales para crecimiento in vitro de 0,5-1,5 cm de largo, que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos y luego transferidas a un medio de elongación con macronutrientes N₃₀K (Margara, 1988), complementado con micronutrientes de MS (Murashige y Skoog, 1962), enriquecido con 0,3 mg/L de bencilaminopurina (BAP), 30 g de sacarosa, 8 g de agar y pH 5,7. Los brotes elongados fueron trasplantados al mismo medio de cultivo pero sin BAP por 15 días para inducir la rizogénesis.

Las plantas obtenidas por cultivo in vitro se aclimataron en bolsas de 1L de volumen con sustrato compuesto de 40% de tierra de hoja, 25% de perlita, 25% de arena y 10% de tierra agrícola en un invernadero por 15 días, manteniendo una alta HR a través de riegos por microaspersión. Posterior a esta etapa, las plantas se transfirieron a condiciones de

invernadero convencionales y cuando las plantas se lignificaron, se recolectó mediante bisturí 1-2 g de floema, para realizar una prueba de DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977), además de RT-PCR (MacKenzie *et al.*, 1997) para aquellas que presentaran resultados negativos; todo lo anterior para determinar la presencia del virus (GRSLaV).

A los 20, 40, 60, 80 y 100 días después de cada tratamiento térmico, se evaluó el crecimiento de las plantas a través del largo total de brotes nuevos, el número total de nudos formados y largo de entrenudos.

Diseño experimental y análisis estadístico

Termoterapia

El ensayo de termoterapia fue totalmente al azar compuesto por 5 tratamientos de exposición térmica, en el cual se realizó un análisis a las plantas madres al final de cada período, en las cuales se evaluó el número de nudos y largo de brotes nuevos. Cada tratamiento estuvo compuesto de 5 plantas (repeticiones).

Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparaciones múltiples, Tukey al 95% de significancia.

Plantas in vitro

Se obtuvieron 10 plantas de cada período de tratamiento térmico a través de cultivo in vitro de yemas apicales, donde cada planta fue considerada como una repetición. En las plantas se determinó el porcentaje de plantas sanas.

Para el análisis de los datos, se empleó la prueba t de Student de comparación de porcentajes con un 95% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de plantas en termoterapia

El mayor crecimiento de las plantas, expresado como largo total de brotes y número de nudos, se observó a los 60 días de tratamiento térmico (Figuras 1 y 2). El punto de inflexión en la curva se verifica a los 44 días. A partir del día 60, las plantas mostraron menor crecimiento de brotes, en cambio el número de nudos es constante hasta el final del ensayo. Este comportamiento concuerda con lo expresado por Pérez (1984), quien indica que temperaturas entre 30-40°C por varias semanas reducen considerablemente el crecimiento en vid.

Cuando se comparan los resultados, se observa que existieron diferencias en las tasas de crecimientos de largos de brotes nuevos entre los intervalos 0-20 días y 40-80 días con un alza en la curva mucho más marcado. Hacia el final del ensayo, día 100, no se observaron diferencias significativas.

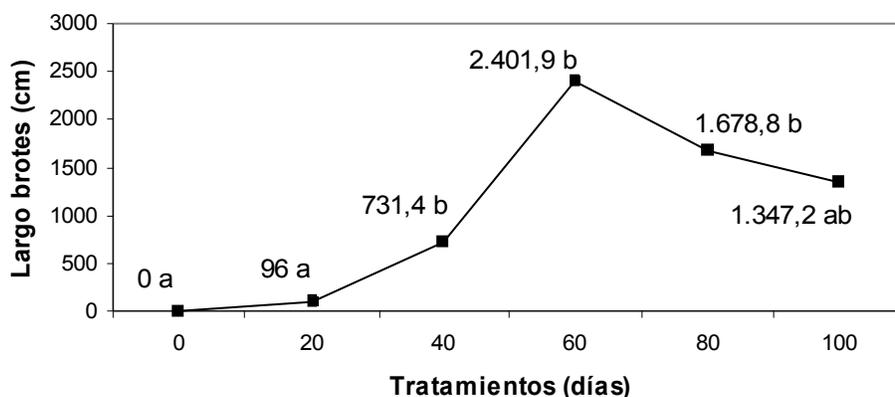


Figura 1. Largo de brotes nuevos de plantas de vid var. “Red Globe” infectadas con GRSLaV sometidas a termoterapia, 37°C por 100 días.

Medias seguidas con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Tukey al 95% de significación.

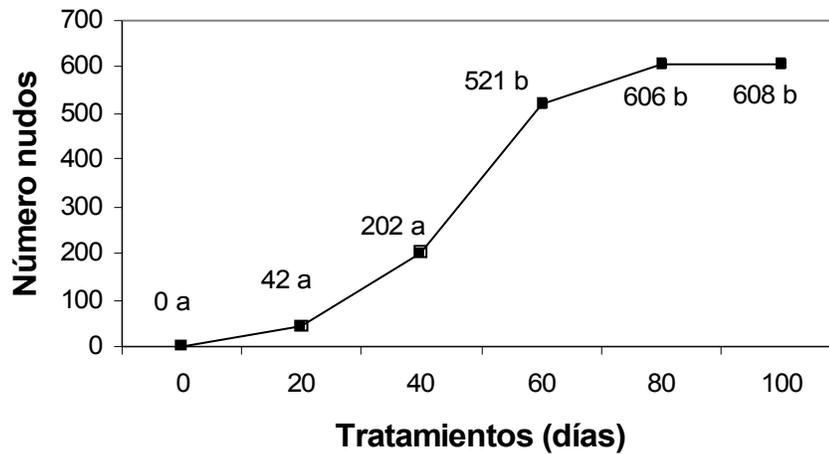


Figura 2: Número de nudos totales de plantas de vid var. “Red Globe” infectadas con GRSLaV sometidas a tratamiento de termoterapia a 37°C.

Medias seguidas con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Tukey al 95% de significación.

El número de nudos generados mostró un aumento gradual hasta los 40 días, un aumento más importante hasta los 60 días y luego una estabilización. El punto de inflexión en la curva se verifica a los 42 días. Tomando en cuenta esto y la curva de crecimiento de brotes nuevos de las plantas, se deduce que entre los tratamientos a los 20, 40 y 60 días hubo una mayor tasa de crecimiento de nudos y una mayor tasa de crecimiento de brotes nuevos (Figuras 1 y 2), acompañado de entrenudos más largos (Figura 3). Desde el día 60 en adelante, con una supresión del crecimiento de brotes y la estabilización en el número de nudos, el largo de los entrenudos a partir del día 60 se hizo menor comparado con los tratamientos térmicos anteriores.

Se observaron diferencias entre los tres primeros y los tres últimos tratamientos. Lo anterior muestra que al inicio del ensayo el número de nudos fue aumentando paulatinamente hasta el día 60, donde el número aumentó fuertemente y en forma constante hacia los días 80 y 100 días de termoterapia.

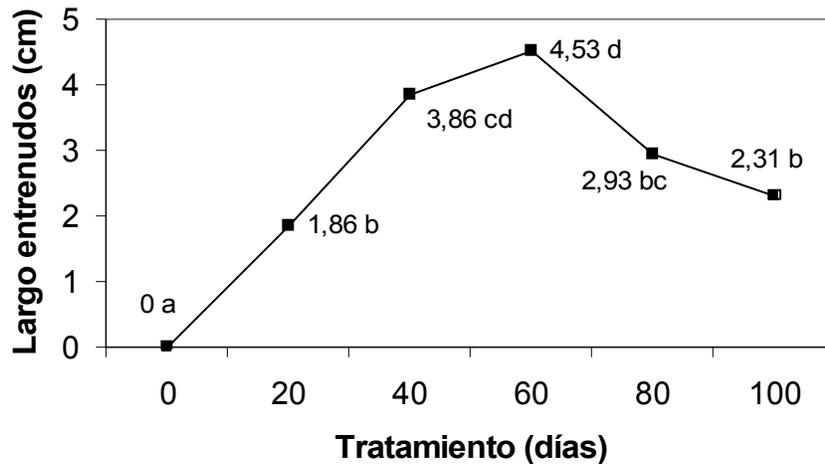


Figura 3: Largo promedio de los entrenudos de plantas de vid var. “Red Globe” infectadas con GRSLaV sometidas a tratamiento de termoterapia 37°C.

Medias seguidas con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Tukey al 95% de significación.

En cuanto al largo de los entrenudos, existen diferencias entre los intervalos 0-20 y 40 días de tratamientos térmicos, dado por el fuerte crecimiento de brotes al principio del ensayo. A los 60 días de termoterapia, el largo de entrenudos es máximo coincidiendo con el máximo largo de brotes nuevos. Entre los tratamientos a los 40 y 60 días no existen diferencias, ya que el largo se encuentra cerca de su máximo al día 60. Hacia el final del ensayo (80 y 100 días), no existen diferencias significativas (Figura 3).

Cuando se evalúa las diferencias entre los largos de brotes en cada período de termoterapia ($T_{20}-T_0$; $T_{40}-T_{20}$; $T_{60}-T_{40}$; $T_{80}-T_{60}$; $T_{100}-T_{80}$), se observa una diferencia de largos a los 60 días, seguido por el tratamiento a los 40 días con una diferencia menor (Figura 4). Estas diferencias entre los días de tratamiento también se demuestran tanto en la velocidad de crecimiento de los brotes, como en el número de brotes nuevos generados en cada tratamiento. En el caso del tratamiento al día 60 hubo 70 brotes nuevos, siendo mucho mayor que los 36 brotes generados al día 40 de exposición térmica.

Queda en evidencia, que la máxima diferencia entre los tratamientos, se observa en el día 60 con un aumento de las diferencias en el promedio en forma gradual desde el día 0. A partir del día 60 de exposición en cámara de termoterapia, se ve una baja hacia los 80 y 100 días con una fuerte supresión del crecimiento, expresado con números y largos de brotes mucho menores.

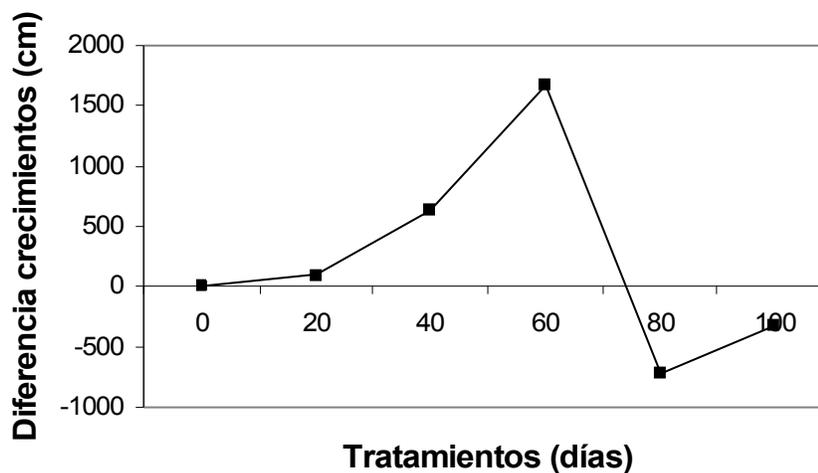


Figura 4: Diferencias (Delta) entre los largos de brotes nuevos de plantas de vid var. “Red Globe” infectadas con GRSLaV, mantenidas en termoterapia por 100 días.

Efecto del tratamiento térmico y cultivo in vitro sobre el GRSLaV

Una vez aclimatadas y lignificadas las plantas provenientes de propagación in vitro, se realizó primero la prueba DAS-ELISA y luego RT-PCR a las plantas que resultaran negativas para confirmar el resultado. Para lo anterior, se usó tejido enriquecido en floema lignificado de las plantas de vid.

Las pruebas se realizaron en el mes de junio y según lo descrito por Montealegre *et al.*, (2001), en el período comprendido entre marzo-junio la sensibilidad de ambas pruebas son mayores.

Cuadro 1: Porcentajes de plantas que resultaron negativas al virus GRSLaV mediante pruebas DAS-ELISA y RT-PCR según el período de termoterapia (37°C) y posterior cultivo in vitro. Se consideró 10 plantas aclimatadas y lignificadas por cada período.

Medias seguidas con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Tukey al 95% de significación.

Tratamientos (días)	Repeticiones	Negativas (DAS-ELISA)	Negativas (RT-PCR)
0	10	0% a	0% a
20	10	10% a	10% a
40	10	80% b	60% b
60	10	10% a	0% a
80	10	0% a	0% a
100	10	0% a	0% a
Plantas saneadas		10	7

En el cuadro 1 los mayores porcentajes de plantas negativas al virus en las pruebas DAS-ELISA y RT-PCR se concentraron a los 40 días de termoterapia, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos térmicos.

Se observó que el número de plantas saneadas de ambas pruebas fue distinto (10 y 7 resp.), ya que la prueba RT-PCR es en varias órdenes de grandeza mucho más sensible que DAS-ELISA (Acheche *et al.*, 1999).

Acheche *et al.* (1999), sometieron estacas de vides de diferentes variedades a pruebas ELISA y RT-PCR para verificar la existencia del virus GLRaV-3. El porcentaje de muestras que resultaron negativas al virus mediante ELISA (54%) bajó a un 29% al realizar la prueba RT-PCR, al igual que la baja que presentó este estudio.

Así mismo Nolasco *et al.* (2000), en estacas de vid de distintas variedades obtuvieron un 40% de plantas negativas al *Rupestris Stem Pitting associated Virus-1*. Sin embargo, al realizar la prueba RT-PCR este resultado bajó a un 15%. Con estos resultados se puede concluir que la prueba ELISA no es una herramienta confiable para los propósitos del diagnóstico, como la probabilidad que un resultado negativo corresponde a una muestra verdaderamente negativa es baja.

Valero *et al.* (2003), obtuvieron 72% de plantas sanas de vid cv. Napoleón obtenidas a partir de la tercera yema de los brotes crecidos in vitro con 45 días de termoterapia. Este porcentaje fue claramente menor al 100 y 90% obtenidos al usar la primera y segunda yema del brote respectivamente. Pero el rango de sobrevivencia de 80% en cultivos establecidos

in vitro provenientes de las yemas basales y medias de una planta positiva a GLRaV-3, son mucho mayores al compararla con las apicales que obtuvieron un 65% de sobrevivencia. En nuestro caso, sólo se usaron yemas apicales y el porcentaje de plantas sanas alcanzó al 60%.

Sumado a lo anterior, la investigación de Valero *et al.* (2003) muestra valores de 93% de plantas libres de GLRaV-3, al termo tratarlas (35-39°C) durante 60 días, aislando yemas apicales de 3-5 mm. Sin embargo, al usar material proveniente de la segunda y tercera yema del brote el porcentaje de plantas libres del virus baja a 90% y 72% respectivamente.

El porcentaje de plantas saneadas de GRSLaV obtenidas en este estudio, concentradas casi exclusivamente a los 40 días de termoterapia, coincide con el punto medio en la curva de crecimiento de las plantas (largo de brotes) que comenzó a los 20 días y que crecieron fuertemente llegando a su máximo al día 60.

Es posible que la aislar in vitro yemas individuales sin tejidos anexos aumente la obtención de plantas sanas, sin embargo, cuando se disminuye el tamaño del explante, se reduce la posibilidad de alcanzar una planta completa in vitro (Leonhardt *et al.*, 1998).

Staudt y Kassemeyer (1994), buscando eliminar closterovirus con una termoterapia a 25-27°C, no obtuvieron plantas sanas. Por otra parte un clon de la variedad Rauschling, sistemáticamente infectado con GLRaV-1 y crecido in vitro por 8 años no mostró ningún signo de saneamiento del patógeno, demostrando que para la eficiente eliminación del virus en la planta era necesario una combinación de métodos de limpieza (termoterapia y/o quimioterapia), y no sólo el cultivo in vitro.

Teniendo en cuenta lo anterior, sometieron plantas de vid cv. Rauschling, a termoterapia por 60 días con temperaturas de 36-38°C y a los 46 días, se obtuvo un 100% de plantas saneadas.

Una diferencia pudo haber existido entre los nepovirus y closterovirus a las altas temperaturas en los meristemas de los brotes. Mientras los nepovirus son eliminados con temperaturas cercanas a 25°C, esto sólo ocurrió con los closterovirus cuando las temperaturas fueron superiores a 37°C (Staudt y Kassemeyer, 1994).

Los closterovirus como el GRSLaV, parecen comportarse de forma diferente a los nepovirus al someterlos a técnicas de eliminación viral. Estas distintas respuestas se deben probablemente a las diferentes capacidades de virus parenquimáticos y floemáticos para invadir y diseminarse a través de los tejidos de la planta hospedera. Las diferencias en la morfología del virus (poliedros vs filamentosos) y su estructura molecular pueden probablemente jugar un importante rol para determinar estas distintas capacidades (Valero *et al.*, 2003).

Las enfermedades virales en las vides no han sido, hasta ahora, bien investigadas. Considerando la importancia del tema y el que genetistas y virólogos, incluso después de

décadas de selección clonal recién están discutiendo si el mejoramiento genético debe prevalecer en aspectos sanitarios (Mannini, 2003).

CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos de esta investigación se pueden obtener las siguientes conclusiones:

El mayor porcentaje de plantas saneadas de GRSLaV, se observó a los 40 días con un 60% de plantas sanas, lo que coincide con los puntos de inflexión en las curvas de largos totales y número de nudos de las plantas mantenidas en termoterapia. A los 20 días hubo un 10% de plantas libres del virus. Para los demás tratamientos térmicos no existieron plantas libres del virus.

El mayor crecimiento de brotes nuevos totales, diferencia de crecimientos totales (Δ) y largo de entrenudos de las plantas de vid var. "Red Globe" termotrada a 37°C se observó a los 60 días y el mayor número de nudos a los 100 días.

BIBLIOGRAFIA

- Acheche, H., S. Fattouchi., S. M' Hirshi., N. Marzouki and M. Marrakchi. 1999. Use of optimized PCR methods for the detection of GLRaV3: A closterovirus associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 31-42.
- Angelini, E., N. Bertazzon and M. Borgo. 2004. Diversity among grapevine leafroll-associated virus 2 isolates detected by heteroduplex mobility assay. *Journal of Phytopathology* 152 (7): 416.
- Arancibia, R. 1986. Identificación de virus asociados al enrollamiento de la hoja de vid presentes en cv. Black seedless y la obtención de plantas limpias mediante termoterapia y cultivo de meristemas. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 373 p.
- Castillo, G. 2001. Producción de plantas libres de *Cylindrocarpon destructans*, agente causal del mal del pié negro en *Vitis vinifera* cv red globe. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 91p.
- Clark, M. and A. Adams. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Converse, R. 1994. La preparación de clones de plantas libres de virus. Séptimo Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago (Chile). 10-14 Ene 1994: 167-168.
- Gella, R., M. Lopez Corrales., F. Toribio and J. Marin. 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. *Acta Hort. (ISHS)* 480:173-178.
- Golino, D. 2003. Emerging grapevine diseases. 14th ICVG Conference, Locorotondo 12-17 September.
- Herrera, G. y M. Madariaga. 2001. Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile. *Agricultura. Técnica.* 61: 393-400.
- Juarez, J., N. Duran-Vilan and J. Arregui. 1988. Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 217-220.
- Leonhardt, W., Ch. Wawrosch., A. Auer and B. Kopp. 1998. Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using *in vitro* thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and organ culture* 52: 71-74.

- Luppichini, M. 2000. Termoterapia y cultivo de meristemas para la eliminación del virus del enanismo amarillo de la cebolla, en un clon de ajo. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 254 p.
- Mackenzie, D., M. Maclean, S. Mukergi and M. Green. 1997. Improved RNA extractions from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase Chain reaction. *Plant Disease* vol. 81 (2): 222-225.
- Mannini, F. 2003. Virus elimination in grapevine and crop performance. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September.
- Mannini, F., V. Gerbi and R. Credi. 1998. Heat-treated v. virus-infected grapevine clones: Agronomical and enological modifications. *Acta Horticulturae (ISHS)* 473:155-164.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis. Ediciones Mundi-prensa, Madrid.
- Montealegre, J., N. Fiore, C. Valdivia, S. Prodan y A. Pino. 2001. Optimización de la detección de virus en vid. 14^o Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Universidad de Talca, Facultad de Cs. Agrarias.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nolasco, G., A. Mansinho, M. Texeira Santos, C. Soares, Z. Sequeira, P. K. Correia and O. A. Sequeira. 2000. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *European Journal of Plant Pathology* 106 : 311-318.
- Perez, J. 1984. Viticultura en la Región del Maule. Aspectos climáticos; manejo de viñedos y producción de vinos. Programa Seminarios, Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento Ciencias Vegetales.
- Perez, J., S. Barros y M. Peppi. 2000. Uso de material de propagación vitícola seleccionado y libre de virus. *Aconex* 66: 7-11.
- Rowhani, A., P. Zhang, A. Golino and J. Uyemoto. 2002. Isolation and characterization of a new closterovirus from grapevine. *Phytopathology* 92 (supplement N° 6).
- Staudt, G. and H. Kassemeyer. 1994. Elimination of Grapevine Leafroll Associated Virus Type I in *Vitis vinifera* cv. Lemberger. *Vitis* 33: 179-180.
- Uyemoto, J., A. Rowhani and D. Luvisi. 2000. An association of rootstock stem lesions in *Vitis* species and different graft-transmissible agents. Proceedings of the 13th ICVG meetings: 83-84.

Uyemoto, J., A. Rowhani, D. Luvisi and C. Krag. 2001. New closterovirus in “Redglobe” grape causes decline of grafted plants. *California Agric.* 55 (4): 28-31.

Uyemoto, J. and A. Rowhani. 2003. Discovery of different grapevine sources with graft-transmissible agents causing union-incompatibility on sensitive rootstocks. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September.

Valero, M., A. Ibañez and A. Morte. 2003. Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 97: 289-296.