



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

GRADO EN ENOLOGÍA

Obtención de plantas de vid libres de
virus mediante el uso de la crioterapia y
la termoterapia

Alumno/a: Alberto Aguado Martínez

Tutor/a: Elena Hidalgo Rodríguez

Julio de 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. OBJETIVOS.....	7
5. MÉTODOS Y MATERIALES.....	8
5.1 Búsqueda de información y bases de datos.....	8
5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica.....	8
6. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	8
6.1 Los virus en la vid.....	8
6.1.1 Tipología y clasificación.....	8
6.1.2 Efectos de la virosis.....	11
6.2 Crioterapia.....	14
6.2.1 Definición y procedimientos.....	14
6.2.2 Resultados y viabilidad.....	18
6.3 Termoterapia.....	20
6.3.1 Definición y procedimientos.....	20
6.3.2 Resultados y viabilidad.....	21
7. CONCLUSIÓN.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN

Hoy en día, los virus son los causantes directos de algunas de las enfermedades más peligrosas y dañinas para la vid. Muchos de estos virus están asociados con síntomas como deformaciones en las hojas y en los racimos que afectarán a factores como el rendimiento, la calidad de la uva o causarán un debilitamiento general de la planta que incluso pueden provocar su muerte. Por estos motivos debemos ser conscientes de la presencia de virus en la vid y trabajar para obtener vides libres de virus. Actualmente, se están desarrollando dos técnicas de cultivo *in vitro* con las que se han obtenido resultados interesantes y que pueden ayudar a solventar los problemas de virus en la vid: la crioterapia o crioconservación y la termoterapia. El motivo de este trabajo es revisar la bibliografía disponible y discutir los protocolos y metodologías de estas nuevas técnicas para la eliminación de virus en la vid y para la obtención de plantas de vid libres de virus.

PALABRAS CLAVE:

Crioterapia, Termoterapia, Vides libres de virus, Virus de la vid, Crioconservación, Cultivo In vitro

ABSTRACT

Nowadays, some of the most dangerous and harmful diseases in vines are directly caused by virus. Most of these viruses are related to symptoms such as leaf and cluster deformations that will affect factors like yield, grape quality or a general plant weakening that may induce its death. For all these reasons we must be concerned about the presence of grapevine virus, and we must work to obtain virus-free vines. Currently, two new and interesting *in vitro* techniques that may help to solve the grapevine virus problem are being developed: cryotherapy or cryopreservation and thermotherapy. The main goal is to review the available bibliography discussing the protocols and methodologies of these new techniques intended for the elimination of grapevine viruses to obtain virus-free vine plants.

KEYWORDS :

Cryotherapy, Thermotherapy, Virus-free vines, Vineyard virus, Cryopreservation, In vitro cultivars.

2. INTRODUCCIÓN

La vid es una planta de la que se han encontrado restos que datan del periodo cuaternario (Meng et al., 2017), es decir, hace más de dos millones de años. Se cree que la domesticación de la vid se produjo por primera vez durante el Neolítico (Bouby et al., 2013). Aunque en estos tiempos ancestrales no hay registros de virus, asumimos que éstos han sido siempre parte del ecosistema y por tanto también de la vid, así como los insectos que actúan de vectores y portadores de dichos virus (Meng et al., 2017). Sin embargo, hasta mediados del siglo XIX no se empezaron a documentar los efectos y síntomas de los virus en la vid (Meng et al., 2017).

Actualmente, la vid es el cultivo perenne con mayor incidencia intracelular de patógenos (Messmer et al., 2021), de hecho, se han identificado más de 80 tipos de virus relacionadas con el cultivo de la vid (Meng et al., 2017), autores como Messmer (Messmer et al., 2021), cifran en 86 los virus patógenos de la vid. Por otro lado, la distribución de los virus de la vid es muy amplia, variada, y, dependiendo de cada familia o especie de virus, se pueden encontrar prácticamente en cualquier zona vitivinícola del mundo, como podemos observar en la Figura 1 (Cieniewicz et al., 2020).

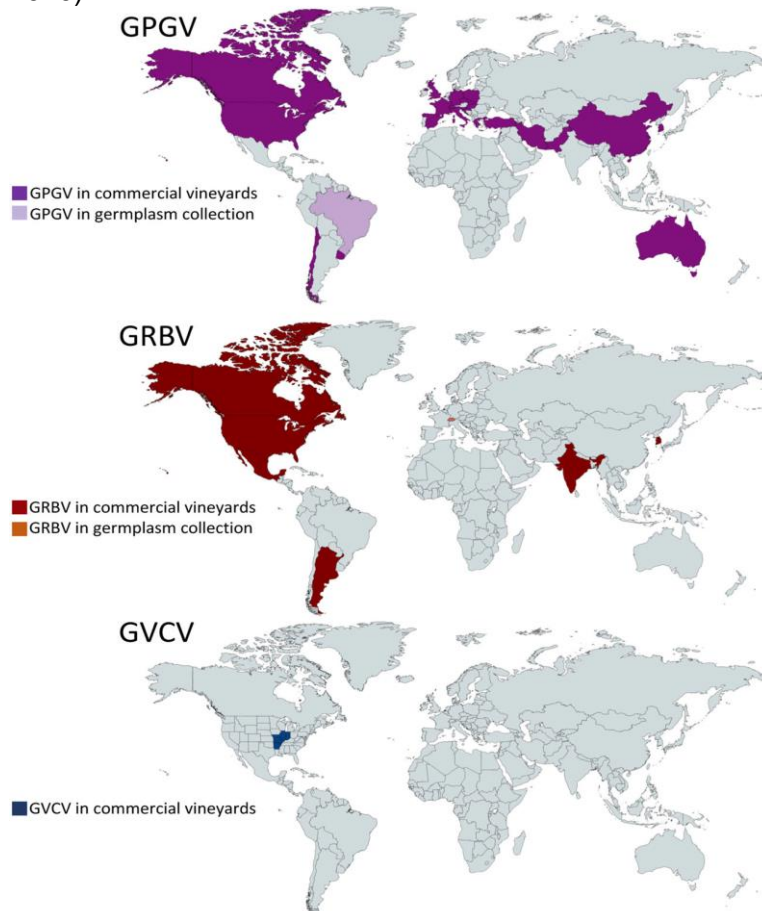


Figura 1: Distribución de los virus GPGV, GRBV y GVCV a escala global (Fuente:(Cieniewicz *et al.*, 2020)

En los últimos años se ha producido un aumento de la incidencia de algunos virus como los virus GPGV (*Grapevine Pinot Gris Virus*) o virus del Pinot Gris, GRBV (*Grapevine Red Blotch Virus*) o virus de la mancha roja y GVCV (*Grapevine Vein Clearing Virus*) o virus del aclareo de nervios, y como podemos ver en la Figura 1, se han convertido en una seria amenaza para el sector vitivinícola mundial (Cieniewicz et al., 2020).

Estudios como el de Alabi (Alabi et al., 2016) clasifican los efectos de los virus en tres ámbitos que afectan a la enología:

- Efectos sobre la vid: Rendimiento y vigor de la planta
- Efectos sobre la uva: Desarrollo, maduración y composición de la uva (azúcar, GAP, acidez, pH)
- Efectos sobre el vino: Acidez total, polifenoles (taninos, antocianos y aromas)

Como consecuencia de estos efectos, encontramos un amplio rango de síntomas y cambios metabólicos en la vid, como podemos ver en la figura 2 (Cieniewicz et al., 2020), y que pueden causar pérdidas económicas devastadoras en términos de rendimiento y de calidad de la producción (Alabi et al., 2016).

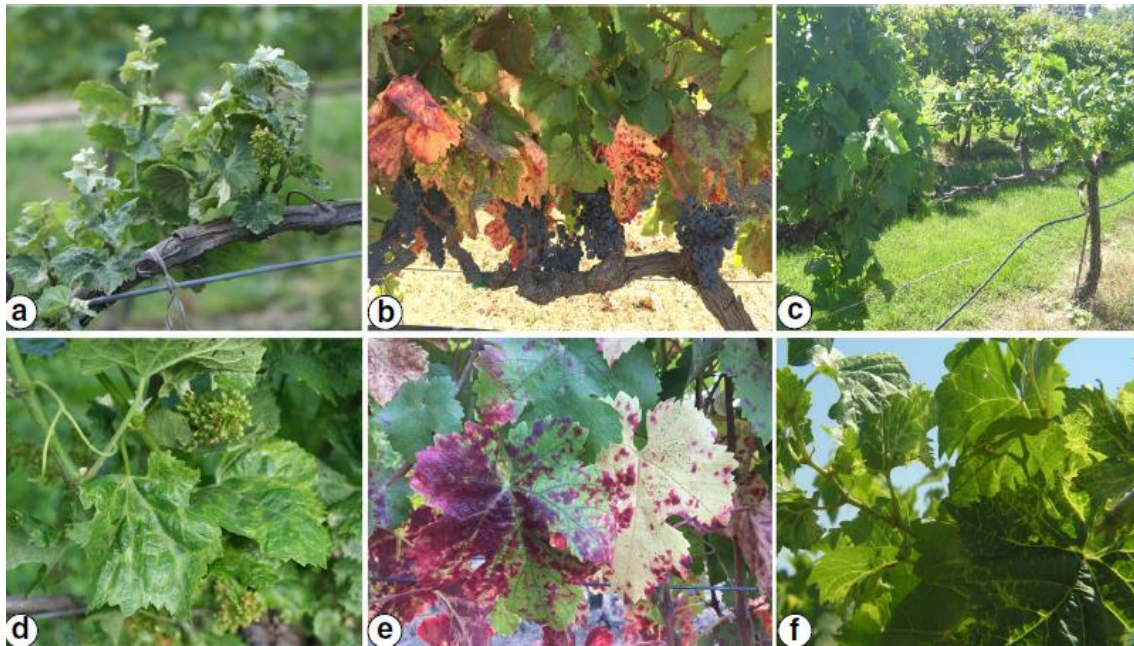


Figura 2: Síntomas visibles de diferentes virus de la vid. Deformaciones producidas por el virus del Pinot Gris (GPGV), imágenes A y D. Síntomas del virus de la mancha roja (GRBV) en Cabernet Sauvignon, imagen B, y en Cabernet Franc, imagen E. Enfermedad del aclareo de nervios (GVCV), imagen F, comparado con una planta sana, imagen C, en la variedad Chardonnay.

Fuente: (Cieniewicz et al., 2020)

Si bien hay mucha literatura sobre los efectos de los virus en el rendimiento y vigor de la planta, la información es más bien escasa cuando nos referimos al efecto en la composición sensorial, organoléptica y química tanto de la uva como del vino (Alabi et al., 2016).

Todos estos efectos vienen condicionados y determinados por muchos factores, la especie o familia de virus, el grado de infección, o el grado de resistencia de la vid. En este último aspecto, se ha demostrado que la especie *Vitis vinífera* es particularmente susceptible y los virus causan un efecto significativamente debilitante en ella respecto a otras especies de vid (Meng et al., 2017). Igualmente se ha comprobado que cada especie de vid puede presentar un grado de resistencia particular según las distintas familias de virus. De esta forma, las especies de vid americanas son generalmente muy susceptibles a virus como el del entrenudo corto infeccioso GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*) y, sin embargo, algunas de ellas pueden ser asintomáticas como en el

caso de *Vitis.labrusca* (Meng et al., 2017). Hay autores que incluso hablan de combinaciones específicas y muy diferenciadas entre los virus y el huésped, y su resultado puede afectar de manera notable a factores tan significativos como la virulencia del virus, la susceptibilidad del cultivo o los daños finales producidos (Alabi et al., 2016).

Teniendo en cuenta los efectos desfavorables producidos por los virus, es evidente que debemos controlar y vigilar la expansión de dichos virus. Además es esencial garantizar la sanidad de las plantaciones mediante controles en la producción y comercialización de las plantas de vid ya que, como sabemos, la multiplicación de la vid se produce de manera vegetativa (Messmer et al., 2021). Por consiguiente, sin esa garantía de sanidad, podemos llegar a plantar vides ya infectadas provenientes de cepas madre con virosis.

Para garantizar dicha sanidad, según la legislación española, únicamente se pueden comercializar plantas de vid certificadas oficialmente como libres de determinados organismos nocivos (MAPA, 2005). En el caso de los virus de la vid, esos organismos nocivos, están regulados en el Real Decreto 208/2003 del 21 de Febrero (MAPA, 2005) recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de plagas reguladas no cuarentenarias que requieren inspección visual para determinar su presencia y, en determinados casos, muestreo y ensayo. (Fuente: (MAPA, 2005))

Género o especie	Plagas reguladas no cuarentenarias
Materiales de multiplicación de <i>Vitis</i> L. distintos de las semillas	Virus del mosaico del <i>Arabis</i> [ARMV00] Virus del entrenudo corto infeccioso [GFLV00] Virus del enrollado de la vid 1 [GLRAV1] Virus del enrollado de la vid 3 [GLRAV3]
Portainjertos de <i>Vitis</i> spp. y sus híbridos, excepto <i>Vitis vinifera</i> L.	Virus del mosaico del <i>Arabis</i> [ARMV00] Virus del entrenudo corto infeccioso [GFLV00] Virus del enrollado de la vid 1 [GLRAV1] Virus del enrollado de la vid 3 [GLRAV3] Virus del jaspeado de la vid [GFKV00]

Según la normativa vigente, se inspeccionarán estos tipos de virus en el material vegetativo y en los portainjertos y, cuando se detecten dichos organismos nocivos, como consecuencia de los controles oficiales, se tomarán las medidas pertinentes para su control (MAPA, 2005).

Por consiguiente, podemos indicar tres importantes razones para eliminar a los virus de las plantas de vid:

1. Los efectos sobre la vid conllevan reducciones en el rendimiento y vigor de la planta y diferencias en la composición tanto de la uva como del vino que se elabora con ella.

2. La multiplicación vegetativa de la vid favorece la expansión y la infección de los virus.
3. La legislación española solo permite la comercialización de plantas libres de determinados virus (los que figuran en la Tabla1).

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la vid es uno de los más importantes en España, el país con mayor superficie de vid cultivada con 966 millones de hectáreas (OIV, 2021). Además, es indudable la importancia del sector vitivinícola en España, siendo un país puntero en exportación, consumo y también en producción de vino con 33,5 millones de hectolitros elaborados en el año 2018 (OIV, 2021).

En un contexto de cambio climático, que está afectando seriamente a las condiciones sanitarias de los cultivos, es vital controlar el estado sanitario de nuestros viñedos. Aunque no se dispone de datos precisos sobre las pérdidas económicas asociadas a los virus de la vid, hay que vigilar y controlar la presencia de dichos virus, unos patógenos frente a los que no existe tratamiento específico y que pueden ser responsables de muchas enfermedades y/o malformaciones. Además de los efectos directos sobre la planta, los virus tienen un efecto debilitante sobre la vid (Meng et al., 2017), lo que la hace que sea más susceptible a otras nuevas enfermedades, entrando así en un ciclo muy desfavorable para la planta.

Debido a la importancia del cultivo de la vid tanto en España como en el mundo, a los efectos tan desfavorables de los virus de la vid y a la falta de tratamiento directo frente a ellos, debemos ser conscientes de lo esencial que es la obtención de vides libres de virus para así poder obtener una uva de la mejor calidad posible.

Actualmente, el manejo contra los virus de la vid se basa únicamente en la prevención (Fuchs, 2020) y en el control de las plagas que son vectores de dichos virus. Como no hay tratamientos específicos para luchar contra los virus, se están ensayando nuevos métodos para eliminar los virus de la vid.

Por consiguiente, nos ha parecido pertinente hacer una revisión sobre las bases científicas y los resultados de algunos de estos métodos, como la crioterapia y la termoterapia, cuyos resultados preliminares, dirigidos a la obtención de plantas de vid libres de virus, son prometedores.

4. OBJETIVOS

Los objetivos de esta revisión bibliográfica son los siguientes:

- Describir los efectos de los virus en la vid y explicar la importancia de la obtención de vides libres de virus.
- Revisar las técnicas y protocolos de la crioterapia y la termoterapia y sus efectos sobre los virus de la vid.
- Revisar los resultados de la crioterapia y la termoterapia para la obtención de plantas de vid libres de virus.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Búsqueda de información y bases de datos

Esta revisión bibliográfica se ha realizado utilizando la información obtenida en diferentes bases de datos y diferentes “webs”, como, Vitis-Vea, WOS (*Web Of Science*) y *ScienceDirect*. En dichas bases de datos se han seleccionado los artículos científicos o estudios relacionados con el tema propuesto en el trabajo. Debido a los cientos de artículos relacionados y para filtrar toda la información obtenida, se utilizaron las palabras clave “Crioterapia”, “Termoterapia”, “Vides libres de virus”, “Virus de la vid”, “Crioconservación” y “Cultivo *in vitro*”, tanto en inglés como en castellano. Además, se tuvo en cuenta el año de publicación, priorizando los artículos de los últimos 20 años.

5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica

Para la redacción de esta revisión bibliográfica, se ha seguido la normativa recogida en el documento “Normas de estilo y formato de TFG Enología” de la página web de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias.

6. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

6.1 Los virus en la vid

6.1.1 Tipología y clasificación

Para poder entender el efecto de los virus en la vid debemos clasificar y describir las distintas familias y géneros de dichos virus, ya que, cada uno, se comporta de manera muy diferente y tiene unos síntomas propios.

Como hemos comentado anteriormente, se han encontrado más de 80 virus relacionados con la vid (Messmer et al., 2021), que se agrupan en 37 diferentes géneros y en 18 familias (Fuchs, 2020). Sin embargo, hay autores como (Fuchs, 2020) que argumentan que solo dos tercios de esos más de 80 virus están relacionados con enfermedades y daños económicos en la vid. Se ha demostrado que los virus del género *Nepovirus*, en particular, son los que más pérdidas económicas causan (Meng et al., 2017). De hecho, todos los virus de cuarentena, se agrupan en únicamente 3 géneros, el género *Nepovirus*, el género *Closterovirus* y el género *Maculavirus* (Fuchs, 2020). A continuación, se describirán estos tres géneros y las características de los virus de cuarentena.

El género *Nepovirus* es el más extendido y el más numeroso dentro de los virus que afectan a la vid (Meng et al., 2017). Dentro de este género encontramos dos de los virus más importantes, el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) y el virus del mosaico del arabis (ArMV) (Fuchs, 2020).

Virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV)

El virus del entrenudo corto infeccioso se describió por primera vez en Francia en 1865 y sus síntomas son muy amplios como podemos ver en las imágenes de la Figura 3. Estos síntomas varían desde malformaciones en las hojas, decoloraciones amarillas en las partes vegetativas e incluso hinchamientos y decoloraciones en los nervios (Meng et al., 2017).



Figura 3: Síntomas del virus del entrenudo corto infeccioso (Fuente:(Pasteur & Koch, 2014).

Virus del mosaico del arabis (ArMV)

El virus del mosaico de la vid se detectó por primera vez en 1963 en viñedos de la antigua Yugoslavia (Pasteur & Koch, 2014), aun así, ha sido el último virus añadido a la lista de virus de cuarentena de la vid (MAPA, 2005).

La lucha contra los virus pertenecientes a este género se basa en el control de plagas. Los ácaros y los nemátodos son los vectores más comunes de los virus del género *Neporovidae* (Fuchs, 2020). Al ser del mismo género que el virus del entrenudo corto infeccioso, los síntomas del ArMV son muy similares, sobre todo en las malformaciones de las hojas (Pasteur & Koch, 2014).

Otro de los géneros importantes es el de los ***Closterovirus***, al cual pertenecen dos virus muy dañinos, los virus del enrollado de la vid 1 y 3 (GLRaV1 y GLRaV3) *Grapevine Leaf Roll Virus*. Además, a la familia de los *Closteroviridae*s también pertenecen los demás virus relacionados con el enrollado de la vid, GLRaV2, GLRaV4, GLRaV7 y GLRaV13 (Fuchs, 2020).

Virus del enrollado (GLRaV)

El primer caso documentado de transmisión del virus del enrollado se produjo en Alemania en 1936 por Schau, aunque previamente, en 1853 ya se habían descrito y observado algunos de sus síntomas.

Los síntomas más comunes se producen en las hojas con la aparición de clorosis y con una coloración verde en sus nervios, como podemos ver en la Figura 4 (Meng et al., 2017). Además, la hoja puede volverse más fina, más endeble e incluso caerse de la planta (Pasteur & Koch, 2014).

Actualmente, las pérdidas económicas del virus del enrollado son abrumadoras, en algunos artículos recientes (Pasteur & Koch, 2014) se estima un impacto económico desde 25.000 hasta 40.000 dólares por hectárea en estudios realizados en Nueva York en cepas con 25 años.



Figura 4: Síntomas visibles en las hojas del virus del enrollado en la vid
Fuente: (Meng et al., 2017).

Finalmente, dentro del género de los **Maculavirus**, se ubica un virus tan importante como el del jaspeado (GFkV), además de otros como el virus del *Redglobe* (GRGV) (Fuchs, 2020).

Virus del jaspeado (GFkV)

El virus del jaspeado tiene un largo periodo de latencia por lo que se le ha relacionado históricamente con una mayor y más longeva asociación con *Vitis vinifera*. Actualmente, está extendido por todo el mundo, tanto en los cultivos de vid europeos como en muchos de los portainjertos americanos (Meng et al., 2017).

Sus síntomas los podemos observar en las imágenes de la Figura 5. Los más livianos son el aclareo de la coloración de los nervios y los más severos pueden llegar al retorcimiento y curvatura las hojas (Meng et al., 2017).



Figura 5: Síntomas visibles en las hojas infectadas por el virus del jaspeado
Fuente:(Pasteur & Koch, 2014).

Además de los virus de cuarentena, la vid sufre el ataque de ciertos virus que son menos comunes y menos estudiados, pero que podrían presentar un problema mayor en un futuro. Uno de estos virus es el de las manchas rojas o *Red Blotch Virus* (GRBV), el cual pertenece al género de los *Grablovirus* (Fuchs, 2020), y cuyos síntomas no se describieron hasta el año 2011. Su efecto se puede observar claramente en la Figura 6 (imagen B) ya que provoca unas características manchas rojas en las hojas, sobre todo en la época del envero (Cieniewicz et al., 2020).

Otro de los virus en auge es el del aclareo de nervios o *Grapevine Vein Clearing* (GVCV), perteneciente al género de los *Badnavirus* (Fuchs, 2020). Sus síntomas más comunes, detallados en la Figura 6 (imagen A), son la aparición de hojas deformes cuyos nervios se vuelven más translúcidos (Cieniewicz et al., 2020).



Figura 6: Síntomas visibles en las hojas infectadas por los virus del GVCV (A) y del GRBV (B) respectivamente (Fuente: (Pasteur & Koch, 2014).

En la Tabla 2 se recogen los síntomas más comunes de los diferentes virus anteriormente descritos.

Tabla 2: Recopilatorio de los síntomas de los principales virus de la vid. (Fuente: Elaboración propia)

VIRUS	SÍNTOMAS
GFLV (Virus del entrenudo corto)	Decoloraciones amarillas en los órganos Malformaciones e hinchazones de las hojas
ArMV (Virus del mosaico del arabis)	Malformaciones en las hojas
GLRaV (Virus del enrollado)	Clorosis, nervios verdes y hojas más débiles
GFkV (Virus del jaspeado)	Hojas curvadas, retorcidas y nervios más claros
GRBV (Virus de la mancha roja)	Manchas rojas en las hojas
GVCV (Virus del aclareo de nervios)	Hojas deformes y nervios translúcidos

6.1.2 Efectos de la virosis

Los virus en la vid llevan a cabo un espectro muy amplio y variado de efectos cuya gravedad depende de muchos factores, como la virulencia del virus (Cieniewicz et al., 2020) o el grado de resistencia o de tolerancia de la planta (Alabi et al., 2016). Por este motivo, los resultados descritos en los distintos estudios que analizan los efectos de los virus en la vid son de casos particulares, condicionados por los factores propios de cada estudio y, de esta manera, las conclusiones obtenidas no serán extrapolables a otras condiciones o a distintas variedades.

Para analizar este espectro tan amplio, se suelen dividir los efectos de los virus en tres apartados, efecto sobre el desarrollo de la vid, efecto sobre la composición de la uva y efecto sobre la calidad del vino final (Alabi et al., 2016).

Efecto en el desarrollo de la vid

Los efectos de los virus sobre el desarrollo de la vid se manifiestan en dos aspectos tan importantes como son el rendimiento y el vigor de la planta. Aunque, de manera general, las vides infectadas o con alguna enfermedad son menos productivas y menos vigorosas que las vides sanas (Meng et al., 2017), el grado de los daños es muy variable.

Se han hecho numerosos estudios sobre el efecto de los virus sobre el rendimiento del cultivo. El de Alabi (Alabi et al., 2016) es de los más recientes y completos. Se realizó sobre la variedad Merlot en tres años y demostró que determinados virus como el del enrollado (GLRaV), pueden tener un claro efecto sobre el rendimiento del cultivo infectado. Los resultados mostraron una reducción en el número de racimos por cepa de entre el 14 y el 20 por ciento en vides con síntomas (Alabi et al., 2016). En otras variedades, como la Sultana, se han observado también diferencias en el rendimiento debido al efecto debilitante de los virus (Woodham & Emmett, 1984). Otros autores como Meng (Meng et al., 2017) encontraron una reducción mayor del rendimiento que puede llegar a ser del 26% en vides afectadas por el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) e incluso hasta el 40% en vides afectadas por el virus GLRaV (Pasteur & Koch, 2014).

En cuanto al vigor, encontramos los mismos efectos. Debido a la reducción del vigor, con una superficie foliar mucho menor y una actividad fotosintética reducida (Pasteur & Koch, 1941), hay virus, como el del entrenudo corto infeccioso (GFLV), que disminuyen el número de racimos, presentando también racimos más pequeños (Meng et al., 2017). De hecho, autores como Alabi (Alabi et al., 2016), cifran el efecto en reducciones de entre el 16 y el 28 por ciento en el peso medio de los racimos en vides infectadas por el virus del enrollado (GLRaV) en comparación con vides sin síntomas.

Como resultado de la reducción en el rendimiento y en el vigor de la vid, se producen unas pérdidas económicas cuya repercusión dependerá de factores como la tolerancia de la vid a cada uno de los virus. De hecho, hay viñedos más tolerantes a virus como el GFLV, que pueden producir unos cultivos sanos y con un buen rendimiento y vigor, mientras que otros más sensibles se ven afectados de manera severa mostrando un claro declive en el rendimiento (Pasteur & Koch, 2014).

Por este motivo, los resultados de estos estudios y ensayos estarán muy condicionados por muchos otros factores como la tolerancia de la planta, el grado de virosis, los vectores presentes en la zona o incluso la variedad (Pasteur & Koch, 2014) y (Alabi et al., 2016).

Efecto en la composición de la uva

Los efectos sobre la calidad y la composición de la uva se manifiestan en los análisis de los componentes finales de la uva, como la acidez, los azúcares, el pH o el contenido en polifenoles.

A diferencia de los efectos sobre el rendimiento y vigor, los efectos sobre la composición de la uva son más confusos y menos precisos. Esto es debido a que, aunque podríamos pensar que la calidad de la uva es menor debido al efecto los virus, en ocasiones, al obtener racimos más pequeños, hay parámetros de calidad que pueden verse incluso favorecidos por la infección. Por este motivo, los efectos en los parámetros de calidad no son uniformes y pueden ser inversamente proporcionales al nivel de reducción del rendimiento (Meng et al., 2017). Además factores como la especie de vid también condicionan los efectos sobre la calidad de la uva ya que,

mientras especies de vid americanas como *Vitis labrusca* muestra muy pocos síntomas, *Vitis vinífera* es muy sensible a virus como el del entrenudo corto infeccioso (GFLV) (Pasteur & Koch, 2014).

Aun así, por lo general, lo más habitual es encontrar una reducción en la calidad de la uva en vides infectadas por virus.

En el estudio de Alabi (Alabi et al., 2016) se observa que, desde la época de maduración hasta la vendimia, las diferencias entre la composición de la uva en vides infectadas y sanas se vuelven mucho más significativas. Específicamente, este estudio realizado sobre la variedad Merlot, mostró que, las vides infectadas con el virus del enrollado (GLRaV), sufrieron un efecto importante sobre el pH, que se redujo entre el 2 y el 3 por ciento; sobre la acidez, que sufrió un aumento medio del 8%; y sobre el contenido en azúcares de la baya, el cual se vio ligeramente disminuido y cuyo problema derivó en un menor grado alcohólico del vino (Alabi et al., 2016). Algunos estudios, (Pasteur & Koch, 2014) y (Meng et al., 2017), coinciden en que la causa de estos efectos reside en una maduración tardía y más lenta de la baya debido al efecto de virus como el GLRaV. Sin embargo, no hay literatura que permita extrapolar estos resultados a otras variedades o condiciones.

Efecto en la calidad del vino

Los parámetros analíticos que acusan el efecto de los virus en el vino son muchos, pero por lo general, afectan al pH, a la acidez total, al grado alcohólico, al contenido en polifenoles y a los análisis sensorial y organoléptico (Alabi et al., 2016). Teniendo en cuenta estos parámetros, podemos hablar de unos efectos en el vino tan confusos y poco uniformes como en el caso anterior. Aun así, estudios como el de Pasteur (Pasteur & Koch, 2014), muestran que virus como el GLRaV tienen un efecto notable que se manifiesta en reducciones del contenido en proteínas y en isoenzimas en el mosto.

En la Tabla 3 se recogen los resultados de un estudio realizado en la variedad Merlot por Alabi (Alabi et al., 2016), uno de los pocos que recogen de forma ordenada los efectos de la virosis sobre el vino. En ella podemos observar cómo hay parámetros, como el contenido de taninos, que pueden llegar incluso a aumentar en el caso de las vides sintomáticas.

Tabla 3: Comparación de los parámetros de calidad del vino entre vides infectadas por el virus del enrollado (GLRaV) y vides asintomáticas en la variedad Merlot durante tres años consecutivos (Elaboración propia Fuente: (Alabi et al., 2016).

	2009		2010		2011	
	Asintomática	Sintomática	Asintomática	Sintomática	Asintomática	Sintomática
Alcohol %vol	14,98	13,8	14,8	13,86	14,01	13,24
Acidez g/l	3,3	3,83	6,21	5,95	5,03	5,3
pH	3,84	3,91	3,42	3,38	3,59	3,56
Antocianos mg/l	314	243	670	602	538	530
Taninos mg/l	446	509	1108	805	520	559

Hay otros autores como Meng (Meng et al., 2017), que simplemente descartan la implicación, de virus como el del entrenudo corto infeccioso (GFLV), en parámetros como el contenido en fenoles. Sin embargo, en el caso de los antocianos, se ha demostrado que el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV) puede interferir en sus rutas metabólicas dando lugar a antocianos más inestables (Meng et al., 2017). En la

Tabla 3, vemos cómo en el caso de vides infectadas con virus del enrollado (GLRaV), también existe una reducción del contenido en antocianos totales en el vino (Alabi et al., 2016).

Uno de los efectos más negativos de los virus en la calidad del vino final es, sin duda, la reducción del grado alcohólico. Como podemos comprobar en la Tabla 3, esta reducción del contenido en alcohol, está relacionada con un menor contenido en azúcares y puede llegar a ser del 14% (Alabi et al., 2016).

Finalmente, en el ámbito sensorial, hay muchos menos estudios debido a la subjetividad de este análisis, además, no es fácil describir el efecto de los virus en el vino (Meng et al., 2017). En algunos estudios como el de Alabi (Alabi et al., 2016) en el que se observan las características analíticas de polifenoles en el vino, se argumenta que, al tener menos antocianos, el color es más evolucionado y con menos tonos púrpuras. Además, por lo general, los vinos de vides afectadas por virus tienen un contenido aromático menor (Pasteur & Koch, 2014) y por tanto un peor “*bouquet*” (Meng et al., 2017).

6.2 Crioterapia

6.2.1 Definición y procedimientos

Existen pocos estudios del uso de la crioterapia en comparación con los métodos tradicionales para la eliminación de virus (Bettoni et al., 2016), lo cual puede deberse a que se trata de una técnica reciente (Zvezdana Marković et al., 2018). De hecho, se trata de procedimientos que en fase de experimentación y se necesitarán más ensayos tanto para el desarrollo de protocolos de crioterapia como sobre el efecto en distintas condiciones o factores, ya que la literatura en estos apartados es más bien escasa.

La crioterapia es una técnica de cultivo *in vitro*, basada en la crioconservación, que consiste en someter a la planta a tratamientos a baja temperatura (-196°C) para eliminar patógenos (Bettoni et al., 2016). Esta técnica se empezó a utilizar en la década de 1990 (Zvezdana Marković et al., 2018), y se espera que complemente y/o reemplace a los métodos tradicionales de erradicación de patógenos (Bettoni et al., 2016).

La acción física y anatómica de la crioterapia sobre el material vegetativo, como podemos observar en la Figura 7, afecta a las células infectadas por el patógeno (CIP), que mueren al ser sometidas a temperaturas tan bajas y pasan a ser denominadas células muertas (CM). Las células libres de patógenos (CLP), gracias a los crioprotectores pasan a ser células supervivientes (CS). De esta forma, tras el proceso de crioterapia, el brote estará compuesto por células muertas congeladas y células vivas sin virus que, al revertir las condiciones de baja temperatura, se desarrollarán dando lugar, de manera teórica, a una planta superviviente y libre de virus (Bettoni et al., 2016).

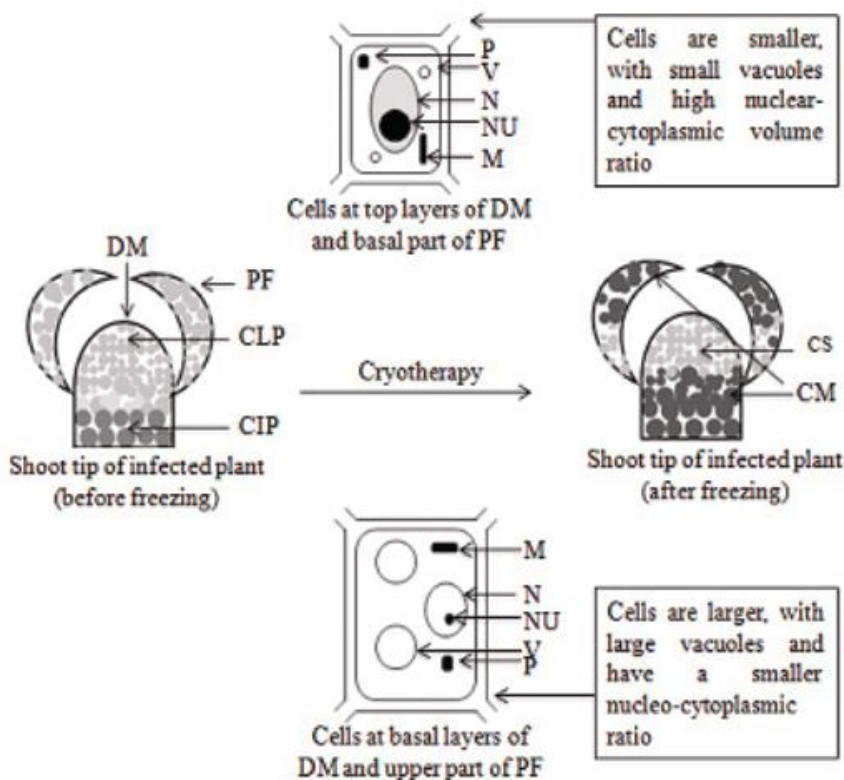


Figura 7: Disposición de las diferencias físico-anatómicas en las células cercanas y alejadas de la cúpula meristemática en la zona apical tras la crioterapia. DM: cúpula meristemática; PF: primera foliar; CLP: células sin patógeno; CIP: células infectadas por patógeno; CS: célula superviviente; CM: células muertas; M, mitocondrias; V, vacuola; NU, núcleo; N, nucléolo; P, protoplasto. (Fuente: (Bettoni et al., 2016)

Antes de comentar los protocolos de la crioterapia, es preciso hablar de la crioconservación ya que ambas tienen mucha relación, de hecho, autores como (Matsumoto & Sakai, 2003) o (Q. Wang et al., 2004) solamente hablan de este método sin hacer referencia a los procedimientos de la crioterapia. La crioconservación es un método de conservación a largo plazo en el cual las plantas se almacenan a una muy baja temperatura en nitrógeno líquido (Z. Marković et al., 2015). Actualmente, es una opción muy útil para la conservación de germoplasma de la vid (Matsumoto & Sakai, 2003) porque permite el almacenamiento de células, tejidos, órganos y meristemas a un bajo coste y durante un tiempo potencialmente ilimitado (Ganino et al., 2012).

También es necesario hablar de cultivo de meristemas o puntas apicales (*Shoot tips*), una técnica de cultivo *in vitro* que consiste en el crecimiento de pequeños brotes apicales de entre 0,5 y 1 cm (Ganino et al., 2012), cada uno con una yema auxiliar y una hoja (Bi et al., 2018). Salvo escasas excepciones, en todos los artículos consultados se utiliza esta técnica para la preparación de la muestra que será sometida a crioterapia. De hecho, en algunos artículos como el de Bi (Bi et al., 2018), se le da una importancia enorme a la preparación de los denominados “*shoot tips*”. Las etapas de la preparación de meristemas apicales se recogen en la Figura 8, en la cual podemos ver la preparación de los meristemas apicales y su posterior crecimiento tras el proceso de crioconservación por microgotas.

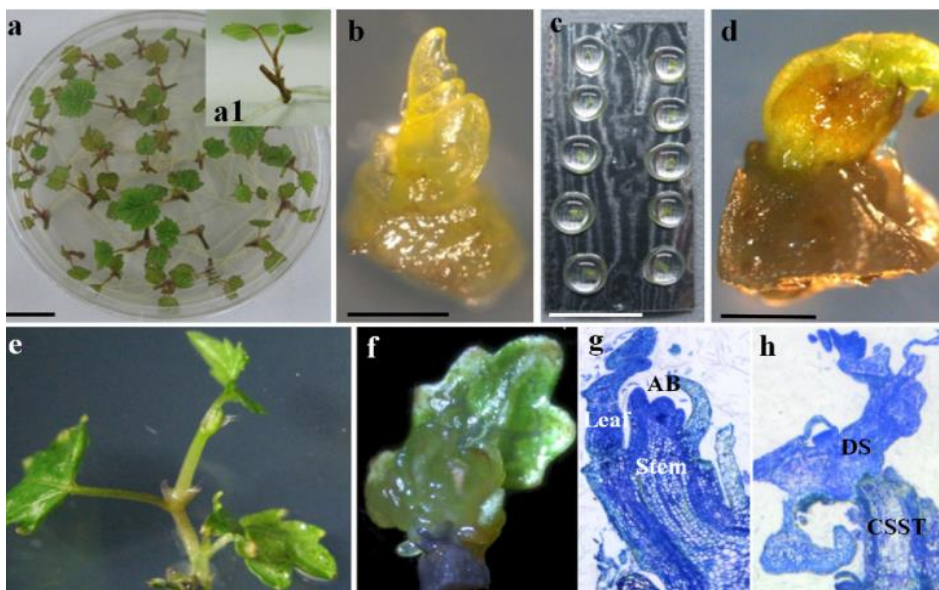


Figura 8: Cultivo de meristemos “shoot tip” en el proceso de criopreservación y recuperación de la variedad Cabernet Sauvignon. (a) Segmentos nodales después de 2 semanas de cultivo de los que se extirparon las puntas de los brotes; (a1) vista más cercana que muestra una yema auxiliar alargada. (b) Una punta apical de brote (1,0 mm) que contiene 5-6 primordios de hoja utilizados para la criopreservación. (c) Microgotas PVS2 que contienen los “shoot tips”. (d) Una punta apical de un brote superviviente después de 7 días de cultivo después de la criopreservación. (e) Un bote apical normal y (f) una estructura desorganizada del brote recuperada de puntas de brotes criopreservados después de 8 semanas de post-cultivo. (g) Observaciones histológicas de brotes normales con tallo, hojas y un brote apical y (h) estructuras desorganizadas recuperadas de puntas de brotes criopreservados después de 6 semanas de post-cultivo. AB yema apical, DS estructura desorganizada, CSST brote apical criopreservado superviviente (Bi et al., 2018).

Dentro de la crioterapia encontramos diferentes técnicas, como la encapsulación-deshidratación o la encapsulación-vitrificación (Bettoni et al., 2016), todas ellas se basan en eliminar patógenos usando bajas temperaturas mientras se protege a la planta de los efectos de dichas temperaturas tan bajas. A continuación, revisaremos las metodologías más importantes, sus procedimientos y los ensayos encontrados de estas técnicas en plantas de vid.

Vitrificación

El fenómeno conocido como vitrificación consiste en un enfriamiento ultrarrápido que se consigue introduciendo el material vegetativo de la planta en nitrógeno líquido (Bettoni et al., 2016) tan rápido que evita la formación de cristales de hielo en las células (Q. C. Wang et al., 2005) y así elimina el potencial daño intracelular de la cristalización (Ganino et al., 2012). Los protocolos de vitrificación se han aplicado a un amplio rango de material vegetativo (Matsumoto & Sakai, 2003) y se basan en la deshidratación de material en soluciones PVS2 o PVS3 (*Plant Vitrification Solution*) de un agente crioprotector como el glicerol (Bettoni et al., 2016). Estas soluciones (PVS2 o PVS3), se componen de glicerol al 30% (p/v), etileno glicol al 15% (p/v), dimetilsulfóxido al 15% (p/v) y sacarosa 0,4M (Matsumoto & Sakai, 2003), (Pathirana et al., 2016) y (Q. Wang et al., 2004).

De manera general, los protocolos de la vitrificación se dividen en diferentes fases, 1) la escisión de tejido meristemático (yemas auxiliares apicales) (Matsumoto & Sakai, 2003), 2) la deshidratación con soluciones de vitrificación (PVS2 o PVS3), 3) el

enfriamiento instantáneo con nitrógeno líquido a -196°C , 4) la recuperación en caliente (baños de 40°C) y 5) la regeneración del material vegetal en un medio de cultivo (Bettoni et al., 2016). En la práctica, cada estudio y cada ensayo tiene su propia metodología y sus propias fases. En algunos estudios (Matsumoto & Sakai, 2003), utilizan 1,5 ml de solución PVS2 a 0°C para deshidratar y luego realizan el enfriamiento con nitrógeno líquido (LN) durante 60 minutos, mientras que otros como (Q. Wang et al., 2003) utilizan 2 ml de PVS2 o PVS3 a 0°C durante 50 minutos, 1 hora en LN y después un baño caliente a 40°C durante 3 minutos.

Vitrificación por microgotas

La vitrificación por microgotas es un método derivado de la vitrificación, que combina la aplicación de soluciones de vitrificación altamente concentradas con tratamientos con agentes crioprotectores (Bettoni et al., 2016). Los protocolos son muy similares a los de la vitrificación, la única diferencia es que, una vez deshidratado, el material vegetativo se coloca sobre láminas de aluminio y se añaden microgotas de PVS2 o PVS3 para lograr un enfriamiento más rápido cuando se sumergen en nitrógeno líquido (Zvezdana Marković et al., 2013). Aun así, cada ensayo tiene su metodología, por ejemplo en la cantidad de PVS2 utilizado o en el volumen de las microgotas, estudios como el de Bi (Bi et al., 2018) utilizan microgotas de $2,5\ \mu\text{l}$, mientras que otros como el de Zvezdana (Zvezdana Marković et al., 2013) utilizan microgotas de $5\ \mu\text{l}$.

La clave para que esta técnica resulte exitosa, es optimizar la tolerancia de la muestra a la deshidratación en las soluciones de vitrificación (Bettoni et al., 2016) y, además, utilizar de manera precisa el proceso de inserción de las microgotas (Bi et al., 2018).

Encapsulación- Vitrificación

La encapsulación- vitrificación es otra técnica de crioterapia derivada de la vitrificación en la cual los brotes apicales se encapsulan en perlas de alginato para obtener una mayor protección del material vegetativo frente a la congelación (Bettoni et al., 2016).

Los protocolos son bastante parecidos entre los distintos ensayos. Anteriormente al proceso de encapsulación, las perlas de alginato se preparan en suspensiones con concentraciones de sacarosa que van creciendo diariamente (Bettoni et al., 2016), en concreto, en el estudio de Wang (Q. Wang et al., 2004) las concentraciones de sacarosa iban aumentando desde $0,25\text{M}$ hasta $0,75\text{M}$ durante tres días. Después, las perlas son rápidamente secadas en tejidos de celulosa (Q. Wang et al., 2004) y seguidamente se produce la deshidratación y el enfriamiento a -196°C como se estipula en el protocolo normal de vitrificación (Bettoni et al., 2016).

Encapsulación- Deshidratación

La encapsulación-deshidratación es una técnica que combina los procedimientos de la encapsulación y la deshidratación en gel de sílice (Zvezdana Marković et al., 2013). El método consiste en la formación de un endospermo artificial que rodea el tejido compuesto por un gel de silicato (Bettoni et al., 2016) en el cual se deshidratan las perlas para después ser sumergidas en el nitrógeno líquido (Zvezdana Marković et al., 2013).

Las fases comunes en todos los ensayos estudiados son la escisión y encapsulación en perlas del material vegetativo, el precultivo en concentraciones de sacarosa acumulativas, la deshidratación en el gel y el enfriamiento a -196°C en nitrógeno líquido (Bettoni et al., 2016).

6.2.2 Resultados y viabilidad

Markovic llevó a cabo varios estudios, en 2013, 2015 y 2018, en los que analizó los resultados obtenidos en diversos estudios para evaluar la viabilidad de la crioterapia. Para ello se centró en la comparación de diversos factores, entre los que destaca la eficacia en la eliminación de virus y la supervivencia y crecimiento de la planta tras el tratamiento (Z. Marković et al., 2015). La viabilidad de esta técnica residirá en que ambos parámetros lleguen a valores altos, ya que, de nada servirá obtener un alto porcentaje de eliminación de virus, si el porcentaje de plantas que sobrevive es muy bajo, y viceversa, de nada servirá obtener un porcentaje muy alto de plantas supervivientes si no están sanas.

Los resultados obtenidos son muy variables, y dependen de la variedad de vid y del tipo de virus, ya que están relacionados con factores como la resistencia de la variedad al frío y al tipo de virus y/o su potencial de regeneración tras la aplicación de la crioterapia (Z. Marković et al., 2015) y (Zvezdana Marković et al., 2018). En la Tabla 4, se recogen una serie de estudios sobre el efecto de la crioterapia con nitrógeno líquido en distintas variedades, y como podemos apreciar, los valores de supervivencia tras la técnica varían desde el 0% en las variedades *Plavac mali* y *Posip* hasta el 75% en la variedad Merlot.

Tabla 4: Supervivencia y regeneración de vides infectadas y sanas tratadas con crioconservación (LN+) y sin crioconservación (LN-) (Elaboración propia: Fuente: (Z. Marković et al., 2015))

Variedad y virus	%Supervivencia		%Crecimiento	
	LN-	LN+	LN-	LN+
Pinot Noir (sana)	50	50	0	0
Pinot Noir (GFLV)	90	37,9	0	0
Chardonnay (sana)	77,5	61,4	25	30
Chardonnay (GFLV)	69,4	50,9	55,6	30,7
Cabernet Sauvignon (sana)	75	57,7	35	46,6
Cabernet Sauvignon (GLRaV-3)	86,9	61,8	62,3	41,6
Merlot (sana)	90	75	90	70
Merlot (GLRaV-3)	85,5	67,9	79,2	61
Plavac Mali (sana)	0	0	0	0
Plavac Mali (GLRaV-1)	0	0	0	0

En todo caso, este estudio es uno de los pocos que compara los efectos de la crioterapia en distintas variedades utilizando la misma metodología y las mismas condiciones. Se necesitaría disponer de muchos más datos y ensayos para comprobar la eficacia de la técnica de forma global y para determinar las variedades que mejor o peor se comportan tras el proceso de crioterapia.

A pesar de que se dispone de un número limitado de estudios en este sentido, he elaborado la siguiente tabla recopilatoria y comparativa con los ensayos más significativos (Tabla 5).

Tabla 5: Recopilación de los resultados más significativos de ensayos de la crioterapia en plantas de vid. (Fuente: Elaboración propia)

Tratamiento	Estudio	% Eliminación de los virus	% Supervivencia de la planta
Vitrificación	(Matsumoto & Sakai, 2003)	ND*	Cabernet Sauvignon: 85% Chardonnay: 86% Cabernet Franc: 33,3% Moscatel: 76,7%
Vitrificación por microgotas	(Z. Marković et al., 2015)	Cabernet Sauvignon (GLRaV3):77% Chardonnay (GFLV): 100%	Cabernet Sauvignon: 61% Chardonnay: 50,9%
Vitrificación por microgotas	(Pathirana et al., 2016)	ND*	Sauvignon Blanc: 30% Gewüztraminer: 41.3% Riesling: 44.7%
Vitrificación por microgotas	(Bi et al., 2018)	ND*	Cabernet Sauvignon: 72% Chardonnay: 66% RedGlobe: 46,7% Kyoho: 45%
Encapsulación-Vitrificación Variedad Bruti	(Q. Wang et al., 2003)	0,5mm (GVA): 94% 1mm (GVA): 97% 1,5mm (GVA): 97% 2mm (GVA): 94%	0,5mm: 50% 1mm: 65% 1,5mm: 60% 2mm: 50%
Vitrificación Variedad: Cabernet Sauvignon	(Collins & Jones, 1981)	PVS2 (50min) (GLRaV-3): 100% PVS2 (75min) (GLRaV-3): 100% PVS2 (100min) (GLRaV-3): 100%	PVS2 (50min): 75% PVS2 (75min): 50% PVS2 (100min): 23%
Vitrificación Variedad: Cabernet Sauvignon	(Collins & Jones, 1981)	0,5mm: (GLRaV-3):100% 1mm: (GLRaV-3):100% 1,5mm: (GLRaV-3):100%	0,5mm: 52% 1mm: 75% 1,5mm: 60%

*ND=No determinado

Como podemos ver en la Tabla 5, dependiendo de la técnica de crioterapia utilizada y de la variedad sometida a tratamiento, los resultados varían significativamente. La variedad Cabernet Sauvignon es la más estudiada en ensayos de crioterapia y podemos ver en los resultados cómo, a pesar de tener porcentajes de supervivencia tras el tratamiento muy variables, desde el 61,8% (Z. Marković et al., 2015) hasta el 85% (Matsumoto & Sakai, 2003), es una de las variedades estudiadas que mejor se adapta a la crioterapia. Actualmente, con los datos disponibles hasta la fecha, los protocolos que se suelen recomendar son muy generales. Sería interesante intensificar los estudios para establecer metodologías más específicas, dependiendo de la variedad y de otros factores que actualmente no se tienen en cuenta.

Por otro lado, en la Tabla 6 se muestra que la duración del proceso de deshidratación con PVS2 y PVS3, previo al enfriamiento con LN, es determinante en la supervivencia de la planta. Se demuestra que, una duración en la deshidratación de 30 minutos (Zvezdana Marković et al., 2013) o de 50 minutos máximo (Collins & Jones, 1981), sería suficiente para obtener un porcentaje alto de supervivencia, y que, con tiempos de deshidratación mayores la eficacia de la crioterapia disminuye (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de la duración del proceso de deshidratación con PVS2 y PVS3 en el %de supervivencia y el % de crecimiento de “shoot tips” sin crioconservación (LN-) y con crioconservación (LN+) (Fuente: (Zvezdana Marković et al., 2013)

	Survival (%±SD)				Regrowth (%±SD)			
	PVS2		PVS3		PVS2		PVS3	
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
Loading control	70.0±14.1b	-	70.0±14.1a	-	70.0±14.1a	-	70.0±14.1a	-
½ PVS/30 min	100.0±0a	-	60.0±0a	-	90.0±14.1a	-	50.0±14.1b	-
PVS/40 min	30.0±14.1cd	40.0±0c	10.0±14.1b	0.0b	30.0±14.1bc	40.0±0b	10.0±14.1c	0.0c
PVS/80 min	8.3±11.8de	0.0e	0.0b	0.0b	8.3±11.8cd	0.0e	0.0c	0.0c
PVS/120 min	10.0±14.1de	10.0±14.1de	0.0b	0.0b	10.0±14.1cd	0.0e	0.0c	0.0c

6.3 Termoterapia

6.3.1 Definición y procedimientos

La termoterapia es una técnica de cultivo *in vitro* en la que se aplican altas temperaturas con la finalidad de obtener plantas en las que los virus hayan sido erradicados (Panattoni & Triolo, 2010). Esta técnica se comenzó a considerar en la década de los 70 (Woodham & Emmett, 1984) y por lo general siempre se utiliza junto con otras técnicas de eliminación de virus como la quimioterapia (Hu et al., 2020) o asociada al cultivo meristemático (Maliogka et al., 2009). Es una técnica bastante utilizada ya que, aunque no se consiga eliminar la totalidad de los patógenos de la muestra infectada, en el caso de los virus, las altas temperaturas frenan su replicación y su tasa de infección (Panattoni et al., 2007).

En el caso de la termoterapia los procedimientos son muy similares entre sí, las únicas variables en cada ensayo son la temperatura y el tiempo de exposición. Hay autores como Gramaje (Gramaje et al., 2009) o McCarthy (McCarthy et al., 1989) que utilizan procedimientos de termoterapia sencillos en los que simplemente se somete a la planta a una temperatura, en el caso de McCarthy, (37,8°C) durante un periodo largo (92 días). Sin embargo, otros procedimientos son más elaborados y en ellos se va aumentando la temperatura progresivamente, como en el ensayo realizado por

Maliogka (Maliogka et al., 2009), en el cual la temperatura inicial era de $26\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el día y $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por la noche, y se iba incrementado gradualmente 3°C por semana hasta llegar a unas temperaturas finales de ensayo de $40\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por el día y $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por la noche.

En algunos estudios analizados, como el de Hu (Hu et al., 2020) o el de Panattoni (Panattoni et al., 2007) se monitorizaron parámetros tan precisos como el fotoperiodo, la intensidad de la luz o la humedad relativa. Concretamente, en el ensayo realizado por Panattoni (Panattoni et al., 2007), el tratamiento se realizó a una temperatura de 36°C , en un fotoperiodo de 16 horas y una humedad relativa del $60\pm 10\%$ durante un periodo de 57 días. En el caso del ensayo realizado por Hu (Hu et al., 2020), la incubación de la muestra se realizó en un fotoperiodo de 16 horas de luz, con una intensidad de 2000 lx, a 37°C durante 20 días.

De esta manera, las diferencias en los procedimientos empleados, más allá de las diferencias en las temperaturas y en el periodo, residen en la utilización de técnicas complementarias a la termoterapia, como son la quimioterapia y/o el uso de compuestos antivíricos.

La quimioterapia consiste en el uso de compuestos químicos para el control de enfermedades en plantas (Panattoni et al., 2007). Los compuestos químicos más utilizados en para el control de virus son los antivíricos como Ribavirin (Hu et al., 2020) la Dihidroxypropiladenina (Panattoni et al., 2007). Los procedimientos son muy similares: el material vegetativo se transfiere a un medio con los compuestos químicos antivíricos y después se somete al tratamiento con termoterapia. Dependiendo del producto químico o antivírico utilizado, los procedimientos varían en tiempo y dosis. Ensayos como los de Hu (Hu et al., 2020) y HU (HU et al., 2021) utilizan un medio con 15 o con 25 $\mu\text{g/ml}$ de Ribavirin, mientras que otros como el de Panattoni (Panattoni et al., 2007) combinan varios químicos y utilizan un medio con 20 g/ml de Ribavirin y una concentración variable de Dihidroxypropiladenina de 20,40, 60 y 80 g/ml .

6.3.2 Resultados y viabilidad

La eficacia de la termoterapia, de la misma forma que en el caso de la crioterapia, dependerá del equilibrio entre dos aspectos: el porcentaje de eliminación de virus y porcentaje de supervivencia de las plantas.

En la Tabla 7 he recogido los resultados más significativos de los tres ensayos revisados más completos, indicando las características del tratamiento y los dos factores comentados anteriormente.

Tabla 7: Recopilación de resultados de ensayos de la termoterapia en plantas de vid.
(Fuente: Elaboración propia)

Tratamiento	Estudios	Origen del material vegetativo	% Eliminación de los virus	% Supervivencia de la planta
De 26°C a 41°C en una semana	(Maliogka et al., 2009)	Variedades: Mantilaria Prevezaniko (viñedos griegos)	Mantilaria (GLRaV):92,4% Prevezaniko (GLRaV):89,3%	Mantilaria: 96,4% Prevezaniko: 77,8%
48 días a 37°C	(Panattoni & Triolo, 2010)	Portainjertos de <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>	GFLV: 100% GLRaV-1: 25,1% GLRaV-3: 24,7% GFkV: 0%	ND*
20 días a 37°C	(Díaz-Barrita et al., 2007)	Portainjerto Chancellor	GLRaV-1: 100% GLRaV-3: 100%	ND*

*ND=No determinado

La eficiencia en la eliminación de virus está relacionada y condicionada por la morfología y estructura de los diferentes virus así como por el genotipo del material vegetativo y las condiciones experimentales (Hu et al., 2020), por lo que los resultados obtenidos en los ensayos de termoterapia son muy confusos y dispares a pesar de que los procedimientos son muy similares. Es muy difícil hacer una comparación entre los diferentes resultados ya que, como muestra la Tabla 7, hay porcentajes de eliminación de virus como en el caso del GLRaV que varían desde un 25% (Panattoni & Triolo, 2010) hasta un 100% de eliminación del virus (Díaz-Barrita et al., 2007) según la variabilidad de los factores anteriormente citados.

Sin embargo, cuando combinamos la termoterapia con la quimioterapia y el uso de antivíricos, los resultados obtenidos son más precisos y mejores. El porcentaje de eliminación de virus aumenta considerablemente en todos los casos, especialmente cuando se utiliza la termoterapia junto con la combinación de Ribavirin y Dihidroxypropiladenina. En la Tabla 8 observamos cómo, en el caso de la eliminación del virus GRSPaV, con un tratamiento de termoterapia en 50 días se consiguió un porcentaje de eliminación del 35,7% mientras que combinando ese mismo tratamiento con 25 µg/ml de Ribavirin, la eficacia fue del 100% de eliminación de virus (HU et al., 2021).

Tabla 8: Eficiencia de la eliminación de virus en plantas de vid regeneradas tras el proceso de quimioterapia, termoterapia y la combinación de ambos tratamientos. CK, control; R15 y R25, quimioterapia con 15 y 25 µg/ml de Ribavirin respectivamente; T, termoterapia a 37°C; R15+T y R25+T, tratamiento de termoterapia a 37°C combinado con 15 y 25 µg/ml de Ribavirin respectivamente. GFkV, virus del jaspeado; GRSPaV, virus asociado a las picaduras del tallo de la vid. (Fuente:(HU et al., 2021).

Treatment ¹⁾	Duration (d)	Elimination rate (%) ²⁾				No. of virus-free plants
		GFkV		GRSPaV		
		Regular PCR	Verified by qPCR	Regular PCR	Verified by qPCR	
CK	50	0 (0/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	0
R15	50	73.3 (33/45)	55.6 (25/45)	24.4 (11/45)	8.9 (4/45)	2
R25	50	84.1 (37/44)	79.5 (35/44)	38.6 (17/44)	13.6 (6/44)	6
T	50	85.7(12/14)	57.1 (8/14)	35.7 (5/14)	35.7 (5/14)	5
R15+T	30	91.7 (33/36)	91.7 (33/36)	61.1 (22/36)	55.6 (20/36)	18
	40	100 (39/39)	100 (39/39)	84.6 (33/39)	84.6 (33/39)	33
	50	100 (32/32)	100 (32/32)	93.8 (30/32)	93.8 (30/32)	30
R25+T	30	100 (31/31)	100 (31/31)	61.3 (19/31)	51.6 (16/31)	16
	40	100 (37/37)	100 (37/37)	91.9 (34/37)	91.9 (34/37)	34
	50	100 (37/37)	100 (37/37)	100 (37/37)	100 (37/37)	37

7. Conclusión

- Los virus de la vid se han convertido en un problema importante en el cultivo de la vid y no existen tratamientos específicos contra ellos. Además, es necesario un estudio más amplio de ciertos virus de la vid no tan conocidos o extendidos ya que en un futuro pueden suponer un problema incluso mayor que los virus de cuarentena.
- La gran variedad de efectos y síntomas asociados a los virus de la vid confirman la necesidad imperiosa de su control y del desarrollo de técnicas para eliminarlos. Por este motivo, los controles sanitarios deben garantizar la sanidad de las plantaciones para no permitir la multiplicación vegetativa de cepas madre infectadas.
- La lucha contra las distintas virosis, con objeto de obtener plantas de vid libres de dichos virus, se está centrando en los últimos años en el uso de técnicas de cultivo *in vitro* combinadas con tratamientos térmicos, como la crioterapia y la termoterapia.
- Los procedimientos de la crioterapia son mucho más elaborados y costosos que los de la termoterapia debido a la utilización de crioprotectores y el manejo de nitrógeno líquido. Además, dentro de la crioterapia existen diferentes metodologías como la vitrificación o la encapsulación que pueden llegar a ser específicas y aumentar la eficacia de la técnica.
- Se han obtenido algunos resultados muy prometedores en ciertos estudios, tanto con crioterapia como con termoterapia, si bien muchos de los procedimientos están aún en fase de experimentación. Por este motivo, de manera general, los resultados son muy variables y no se puede asegurar que estas dos técnicas sean eficaces o no actualmente para la eliminación de virus en plantas de vid.

- Los resultados disponibles en la bibliografía son poco consistentes, debido, entre otros factores, a la escasez de ensayos practicados y a la diversidad de protocolos. Para obtener unos resultados precisos, es necesario realizar ensayos unificados variando únicamente la variedad infectada o el virus para así comprobar el comportamiento de dicha variedad o virus frente a los tratamientos de crioterapia y termoterapia.
- Hoy en día, debido a los costes, ni al viticultor ni al vivero les sale rentable realizar todo un proceso de cultivo *in vitro* con crioterapia o termoterapia a menos que sea un variedad extremadamente desconocida y peculiar. Aun así, en ensayos futuros, con una innovación mayor de las técnicas de cultivo *in vitro*, puede que se obtengan resultados de variedades o virus que sean más susceptibles a la crioterapia y a la termoterapia.

8. Bibliografía

- Alabi, O. J., Casassa, L. F., Gutha, L. R., Larsen, R. C., Henick-Kling, T., Harbertson, J. F., & Naidu, R. A. (2016). Impacts of grapevine leafroll disease on fruit yield and grape and wine chemistry in a wine grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149666>
- Bettoni, J. C., Costa, M. D., Gardin, J. P. P., Kretzschmar, A. A., & Pathirana, R. (2016). Crioterapia: Uma nova técnica para obtenção de plantas de videira livres de viroses. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2). <https://doi.org/10.1590/0100-29452016833>
- Bi, W. L., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2018). Droplet-vitrification cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(6), 590–599. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9931-0>
- Bouby, L., Figueiral, I., Bouchette, A., Rovira, N., Ivorra, S., Lacombe, T., Pastor, T., Picq, S., Marival, P., & Terral, J. F. (2013). Bioarchaeological Insights into the Process of Domestication of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Roman Times in Southern France. *PLoS ONE*, 8(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063195>
- Cieniewicz, E. J., Qiu, W., Saldarelli, P., & Fuchs, M. (2020). Believing is seeing: lessons from emerging viruses in grapevine. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 619–632. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00484-3>
- Collins, M. D., & Jones, D. (1981). 1. Introduction 2. Materials and Methods. 10, 157–159.
- Díaz-Barrita, A. J., Norton, M., Martínez-Peniche, R. A., Uchanski, M., Mulwa, R., & Skirvin, R. M. (2007). The Use of thermotherapy and *in vitro* meristem culture to produce virus-free “chancellor” grapevines. *International Journal of Fruit Science*, 7(3), 15–25. https://doi.org/10.1300/J492v07n03_03
- 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>
- Ganino, T., Silvanini, A., Beghé, D., Benelli, C., Lambardi, M., & Fabbri, A. (2012). Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to

- cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 56(1), 78–82.
<https://doi.org/10.1007/s10535-012-0019-0>
- Gramaje, D., Armengol, J., Salazar, D., López-Cortés, I., & García-Jiménez, J. (2009). Effect of hot-water treatments above 50 °C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection*, 28(3), 280–285.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.11.002>
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., & Ren, F. (2020). Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae*, 271(April), 109462.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109462>
- HU, G. jun, DONG, Y. feng, ZHANG, Z. ping, FAN, X. dong, & REN, F. (2021). Elimination of grapevine fleck virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 87-1 by ribavirin combined with thermotherapy. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2463–2470.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63336-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63336-6)
- Maliogka, V. I., Skiada, F. G., Eleftheriou, E. P., & 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>
- MAPA. (2005). Real Decreto 208/2003, de 21 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid. *Boletín Oficial Del Estado*, 7576–7585. https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-3835%0Ahttps://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2003-3835
- Marković, Z., Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Šimon, S., Vončina, D., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Chatelet, P., & Engelmann, F. (2015). Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 54(Special Issue), 247–251.
- Marković, Zvezdana, Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J. K., & Engelmann, F. (2013). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in vitro shoot tips. *Central European Journal of Biology*, 8(10), 993–1000. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0223-8>
- Marković, Zvezdana, Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Ž., Šikuten, I., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., & Štambuk, P. (2018). Cryopreservation Protocols for Grapevine Shoot Tips. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81802>
- Matsumoto, T., & Sakai, A. (2003). Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, 131(3), 299–304. <https://doi.org/10.1023/A:1024024909864>
- McCarthy, M. ., Ciriami, R. M., & Velsen, R. . Van. (1989). *Virus thermotherapy effects* McCarthy.pdf.
- Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., & Fuchs, M. (2017). Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>

- Messmer, N., Bohnert, P., Schumacher, S., & Fuchs, R. (2021). *Studies on the occurrence of viruses in planting material of grapevines in southwestern Germany. Viruses*, 13(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/v13020248>
- OIV. (2021). *Actualidad de la coyuntura del sector vinícola mundial en 2020. Actualidad de La Coyuntura Del Sector Vinícola Mundial En 2020*, 2–18.
- Panattoni, A., D'Anna, F., Cristani, C., & Triolo, E. (2007). *Grapevine vitivirus A eradication in Vitis vinifera explants by antiviral drugs and thermotherapy. Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.008>
- Panattoni, A., & 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>
- Pasteur, L., & Koch, R. (2014). 1. *Introduction 1. Introduction*. 74(1934), 535–546.
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B., & Carimi, F. (2016). *Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (Vitis spp.) by droplet vitrification. Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2026-1>
- Wang, Q. C., Panis, B., Engelmann, F., & Lambardi, M. (2005). *Conservation of plant genetic resources for food security Cryopreservation of plant germplasm*.
- Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., & Tanne, E. (2003). *Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of Vitis vinifera L. Plant Science*, 165(2), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00091-8)
- Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C. T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E., & Perl, A. (2004). *Cryopreservation of grapevine (Vitis spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(3), 267–275. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000018393.58928.b1>
- Woodham, R. ., & Emmett, R. . (1984). *Effects of thermotherapy and virus status on yield, annual growth and grape composition of Sultana Woodham*.