

Relación entre la susceptibilidad a *Plasmopara viticola* y el grosor del parénquima lagunar en hojas de diferentes clones del cv. Albariño (*Vitis vinifera* L.)

V. Alonso-Villaverde, S. Boso, P. Gago, J. L. Santiago y M. C. Martínez
Misión Biológica de Galicia (CSIC), Apartado de correos 28, 36080 Pontevedra, España,
Tel. +34986854800; Fax.: +34986841362; e-mail <carmenmartinez@mbg.cesga.es>

Palabras clave: hoja adulta, mesófilo, Mildiu, parénquima lagunar, susceptibilidad.

Resumen

Estudios previos realizados en campo y laboratorio permitieron comprobar la existencia de diferentes grados de susceptibilidad a Mildiu entre diferentes clones del cv. Albariño (*Vitis vinifera* L.). Según diversos autores, las causas de esta variabilidad en la susceptibilidad a *P. viticola* pueden ser múltiples, citando entre ellas la diferencia en la estructura de los distintos tejidos y células que componen el mesófilo de la hoja.

Con este objetivo se estudiaron las características histológicas del mesófilo de la hoja adulta pertenecientes a 11 clones de Albariño de la parcela experimental de la Misión Biológica de Galicia (CSIC-Pontevedra). Los resultados obtenidos muestran que el clon que presentó el parénquima lagunar más estrecho, se correspondía con el que presentaba la menor susceptibilidad a Mildiu.

INTRODUCCIÓN

El Albariño (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivares de vid con mayor importancia económica en Galicia (Noroeste de España) y destaca por su alto grado de adaptación a las condiciones edafoclimáticas de esta región. Las abundantes precipitaciones y temperaturas suaves de esta región, favorecen que todos los años se produzcan ataques de Mildiu (*Plasmopara viticola*). Debido a ello, los tratamientos fitosanitarios tienen que aplicarse varias veces al año, lo que incrementa considerablemente los costes de producción y disminuye los beneficios de los productores.

Desde el año 1987, en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), se llevan a cabo estudios sobre la variabilidad intravarietal en Albariño (Martínez *et al.*, 2005), relacionados con diferentes aspectos ampelográficos, agronómicos, moleculares (Loureiro, 1999; Boso *et al.*, 2004a, 2005a, 2007) y de susceptibilidad natural a enfermedades criptogámicas, particularmente a Mildiu (Boso *et al.*, 2004b, 2005b, 2006; Boso and Kassemeyer, 2008).

Las hojas de la vid son diferentes no solamente entre las distintas especies, sino también entre las diferentes variedades de una misma especie. En cuanto a los estudios de las características de los tejidos y las células que conforman el mesófilo de la hoja de la vid, aunque no son muy abundantes, hay algunos estudios realizados sobre distintas especies de *Vitis*, en los que también se incluye alguna vinífera (Bernard, 1978; Palliotti *et al.*, 2000; Ben Salem-Fnayou *et al.*, 2005; Codreanu, 2006). Sin embargo, con respecto a la variedad Albariño, en la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún estudio anterior sobre las características histológicas de sus hojas.

Plasmopara viticola, el agente causante del Mildiu en las Vitáceas, es uno de los patógenos de mayor importancia en la viticultura europea. Ya desde mediados del siglo XX, se iniciaron los primeros estudios dirigidos a comprobar si entre las distintas variedades de *Vitis vinifera* L. había diferencias en cuanto su nivel de resistencia o susceptibilidad a Mildiu (Boubals, 1959; Galet, 1977; Li, 1993; Staudt and Kassemeyer, 1995; Staudt, 1997). Según algunos autores (Ribéreau-Gayon y Peynaud, 1982; Kortekamp and Zyprian, 2003), la velocidad de extensión del micelio en el interior de la planta, parece que depende del grado de susceptibilidad del huésped y del tipo de tejido en el que se produce la infección (más rápido en tejidos jóvenes, más lento en tejidos lignificados), etc.

El objetivo del presente trabajo es comprobar si entre los 11 clones de Albariño (*Vitis vinifera* L.) objeto de estudio, existen diferencias claras y objetivas a nivel histológico en hojas adultas, y si éstas se pueden relacionar con los distintos grados de susceptibilidad al patógeno, observados en estudios previos realizados sobre los mismos clones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudiaron 11 clones pertenecientes a la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.), denominados: CSIC-1, CSIC-2, CSIC-3, CSIC-4, CSIC-5, CSIC-6, CSIC-7, CSIC-8, CSIC-9, CSIC-10 y CSIC-11. Todos ellos se encuentran plantados en la finca experimental situada en la Misión Biológica de Galicia (CSIC) en Pontevedra, España (42° 25' N, 8° 38' W), y proceden de cepas madre centenarias situadas en diferentes puntos geográficos de Galicia (Martínez *et al.*, 2005). La temperatura media en la parcela experimental es de 14,2 °C y la precipitación media de 1650 mm, con fuerte variación anual.

El sistema de conducción es en espaldera, con poda Sylvoz y los tratamientos fitosanitarios y manejo de cultivo fueron idénticos para todas las plantas.

Se seleccionaron 5 cepas por clon y se cogió una hoja de cada una de ellas durante dos años de estudio (2005 y 2007), entre el cuajado y el envero (julio). Cada hoja se recogió del 8º nudo, contando desde la base, de un pámpano fértil que salía de la madera del año.

Técnicas de microscopía

Cada año de estudio, en cada una de las cinco hojas por clon, se cortó una muestra en la zona del limbo próxima al seno peciolar, comprendida entre el nervio central y el primer nervio lateral derecho. Cada una de las muestras vegetales se fijó inmediatamente con F.A.A. (Formaldehído: Ácido acético glacial: Alcohol etílico 50°), se deshidrató y se incluyó en parafina Paraplast Plus (Jensen, 1962; D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Posteriormente se cortaron secciones transversales de 10 µm de grosor, con un microtomo de rotación manual (Leica RM 2235) y se tiñeron con azul de toluidina (Sakai, 1973).

Las preparaciones se observaron a través de un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200) y se obtuvieron imágenes con el software NIS-Elements Basic Research v. 2.34 (Nikon Instruments Inc., Melville, U.S.A.). En cada una de las imágenes se dibujó un rectángulo de 120 µm de ancho y altura variable, en función del grosor de la hoja, dentro del cual se midió el área de cada una de las siguientes capas de tejido: Cutícula+Epidermis superior, Parénquima en empalizada, Parénquima lagunar y Cutícula+Epidermis inferior.

Análisis estadísticos

Cada uno de los parámetros evaluados, se sometió a un análisis de varianza (ANOVA), para comprobar si había diferencias significativas entre unos clones y otros, y se realizó la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) protegida de Fisher, para determinar que clones presentaban la mayor o menor área de cada capa de tejido.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS System v 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, U.S.A.).

RESULTADOS

De la observación cualitativa de los cortes realizados en los distintos clones, la variedad Albariño se caracterizó por presentar una epidermis adaxial uniestratificada, con células que en sección transversal tienen forma redondeada-alargada, con paredes delgadas y cutícula ligeramente engrosada. El parénquima en empalizada está constituido por células alargadas y compactas, con una gran cantidad de pigmentos en su interior. En algunos casos, estas células presentaban un tabique transversal hacia su tercio inferior. En algunos clones también se observó la presencia de cristales de oxalato cálcico. El parénquima lagunar es estrecho, con 4-5 capas de células poligonales y con numerosos huecos. En algunos casos se observó la existencia, en posición intermedia, de una serie de células dispuestas en horizontal. En cuanto a la epidermis abaxial, las células se ven pequeñas, similares a las de la cara adaxial y cubiertas por una capa de cutícula, algo más fina que la cutícula superior.

En cuanto a los análisis cuantitativos, no hubo interacción clon $\times$ año para ninguno de los parámetros evaluados y únicamente se observaron diferencias significativas entre los clones, con una probabilidad del 95 %, en el caso del parénquima lagunar (Tabla 1). Los clones que presentaron el área del parénquima lagunar significativamente mayor fueron CSIC-4 y CSIC-1, mientras que los clones CSIC-3, CSIC-10, CSIC-9, CSIC-6, CSIC-11, CSIC-7 y CSIC-8, presentaron la menor área, siendo CSIC-3 el que presentó la menor área de todos (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Estudios previos sobre la susceptibilidad de estos clones a *Plasmopara viticola*, mostraron por un lado que el Albariño era una de las viníferas más susceptibles a Mildiu, en comparación con un grupo de variedades de vid europeas ampliamente utilizadas (Boso y Kassemeyer, 2008). Además dentro de la variedad Albariño, se observó que unos clones eran más sensibles que otros (Boso *et al.*, 2004b, 2005b; 2006). Aunque algunos autores habían observado diferencias entre vitáceas de distintas especies (Denzer *et al.*, 1995a, 1995b; Staudt and Kassemeyer, 1995; Spring *et al.*, 1998), e incluso entre variedades de la especie *Vitis vinifera* L. (Gindro *et al.*, 2003, 2006), nunca hasta entonces se había demostrado la existencia de diferentes grados de susceptibilidad a Mildiu entre clones de una misma variedad.

Diferentes autores achacan la variabilidad observada entre distintas vitáceas, con relación a la susceptibilidad a enfermedades producidas por hongos, a diferentes causas. En la segunda mitad del siglo XX, se buscaba la causa de este comportamiento, en aspectos anatómicos o histológicos (Nysserakis, 1943, citado en Ribéreau-Gayon y Peynaud, 1982; Manzoni, 1954; Bernard, 1978). Sin embargo, las técnicas de análisis bioquímico-moleculares emergentes en los últimos años del siglo XX, hicieron que

prácticamente se abandonasen este tipo de estudios. A partir de esa época se empezaron entonces a buscar las causas en aspectos relacionados con la genómica, proteómica, etc.

Quizás las diferencias observadas tanto entre distintas variedades de vinífera como entre los clones de Albariño, puedan ser debidas a características intrínsecas de estas plantas, como la longitud de los entrenudos de los pámpanos (Palliotti *et al.*, 2000), la presencia o ausencia de determinados tipos de pelos en las hojas (Kortekamp and Zyprian, 1999; Kortekamp, 2003), el número de estomas (Allègre *et al.*, 2006), las características de los diferentes tejidos que conforman el limbo de la hoja, etc., en el caso del Mildiu en hoja, o a aspectos como la densidad del racimo, tamaño del raspón, etc., para Mildiu en racimo. Sin embargo, se comprobó en estudios previos (Martínez *et al.*, 2005), que los 11 clones tenían la misma densidad de pelos tumbados y erguidos tanto por el haz como por el envés de las hojas. También se comprobó que no existía relación entre la densidad de pelos y el mayor o menor grado de susceptibilidad a Mildiu (Boso *et al.*, 2006).

Algunos autores (Nysterakis, 1943, citado en Ribéreau-Gayon y Peynaud, 1982), apuntan a que entre las hojas de las distintas variedades de *V. vinifera* hay diferencias en cuanto a su grosor y que su estructura anatómica influye considerablemente en el desarrollo del hongo dentro del mesófilo, ya que puede llegar a constituir una especie de barrera de contención difícil de franquear para el hongo. El desarrollo del hongo puede verse limitado si las células están dispuestas de una forma muy compacta, debido a que quedan muy pocos espacios intercelulares y al hongo le cuesta introducirse y desarrollar haustorios. En nuestro caso, el clon CSIC-3 fue el que presentó el parénquima lagunar más estrecho, siendo a la vez uno de los más resistentes a Mildiu (Boso *et al.*, 2006), lo que parece corroborar la hipótesis planteada.

Referencias

- Allègre, M., Daire, X., Héloir, M-C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M. and Pugin, A. 2006. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol.*, 173 (4): 832-840.
- Ben Salem-Fnayou, A., Hanana, M., Fathalli, N., Souid, I., Zemni, H., Bessis, R. et Ghorbel A. 2005. Caractères anatomiques adaptatifs de la feuille de vigne dans le sud tunisien. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 39 (1): 11-18.
- Bernard, A.C. 1978. Évolution de la structure histologique du limbe du *Vitis vinifera* cv. Carignan au cours du cycle végétatif. *France viticole*, 10: 72-185.
- Boso, S., Santiago, J.L. and Martínez, M.C. 2004a. Intravarietal agronomic variability in *Vitis vinifera* L. cv. Albariño. *Am. J. Enol. Viticult.*, 55 (3): 279-282.
- Boso, S., Santiago, J.L. and Martínez, M.C. 2004b. Resistance of Eight different clones of the grape cultivar Albariño to *Plasmopara viticola*. *Plant Dis.*, 88: 741-744.
- Boso, S., Santiago, J.L., Vilanova, M. et Martínez MC. 2005a. Caractéristiques ampélographiques et agronomiques de différents clones du cultivar Albariño (*Vitis vinifera* L.). *Bulletin OIV*, 78 (889-890): 143-158.
- Boso, S., Santiago, J.L. and Martínez, M.C. 2005b. A method to evaluate Downy mildew resistance in grapevine. *Agronomie*, 25: 163-165.
- Boso, S., Martínez, M.C., Unger, S. and Kassemeyer, H-H. 2006. Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albariño clones. *Vitis*, 45 (1): 23-27.
- Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Rodríguez, E., Gago, P., Santiago, J.L. and Martínez, M.C. 2007. Characteristics of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Albariño clones resulting from two clonal selection processes. *Hortscience*, 42 (1): 97-100.

- Boso, S. and Kassemeyer, H-H. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis*, 47 (1): 39-49.
- Boubals, D. 1959. Contribution à l'étude des causes de la résistance de Vitacées au mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de T.) et de leur mode de transmission héréditaire. Thèse de doctorat des sciences. *Ann. Amelior. Plant*, 7: 1-236.
- Codreanu, V. 2006. Anatomia comporată a viței de vie (*Vitis vinifera* L.). Imprimare la Combinatul Poligrafic, Chișinău, Moldavia.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en Histología Vegetal. 1ª edición, Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
- Denzer, H., Staudt, G. and Schlösser, E. 1995a. Host settlement of *Plasmopara viticola* on different susceptible hosts. *Vitis*, 34(2): 45-49.
- Denzer, H., Staudt, G. and Schlösser, E. 1995b. The behaviour of *Plasmopara viticola* on resistant and susceptible grapevines varieties. *Vitis*, 34 (2): 113-117.
- Galet, P. 1977. Les maladies et les parasites de la vigne. Tome I: Les maladies dues á des végétaux. Imp. Le Paysan du Midi, Montpellier.
- Gindro, K., Pezet, R. and Viret, O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Bioch.*, 41: 846-853.
- Gindro, K., Spring, J.L., Pezet, R., Richter, J. and Viret, O. 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis*, 45 (4): 191-196.
- Jensen, W.A. 1962. Botanical Histochemistry. Ed. W.H. Freeman and Company, U.S.A.
- Kortekamp, A. 2003. Leaf surface topography does not mediate tactic response of *Plasmopara*-zoospores to stomata. *J. Appl. Bot.*, 77 (1-2): 41-46.
- Kortekamp, A. and Zyprian, E. 1999. Leaf hairs as a basic protective barrier against Downy mildew of grape. *Phytopatology*, 147: 453-459.
- Kortekamp, A. and Zyprian, E. 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant. Physiol.*, 160 (11): 1393-1400.
- Li, H. 1993. Studies on the resistance of grapevine to powdery mildew. *Plant Pathol.*, 42: 792-796.
- Loureiro, M.D. 1999. Descripción ampelográfica de cepas de *Vitis vinifera* L. denominadas Albariño, procedentes de distintos puntos de la geografía gallega. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Manzoni, L. 1954. La foglia della vite. *Rev. Vitic. Enol.*, 6: 171-178.
- Martínez, M.C., Boso, S. y Santiago, J.L. 2005. Los clones de Albariño (*Vitis vinifera* L.) seleccionados en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de publicaciones del CSIC, Biblioteca de Ciencias, Madrid.
- Palliotti, A., Cartechini, A. and Ferranti, F. 2000. Morpho-anatomical and Physiological Characteristics of Primary and Lateral Shoot Leaves of Cabernet Franc and Trebbiano Toscano Grapevines Under Two Irradiance Regimes. *Am. J. Enol. Viticult.*, 51 (2): 122-130.
- Ribéreau-Gayon, J. y Peynaud, E. 1982. Ciencias y técnicas de la viña. Tomo I y II. Hemisferio Sur. S.A. Buenos Aires.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technol.*, 48: 247-249.

- Spring, J.L., Jermini, M., Maigre, D. et Murisier, F. 1998. Regent, un nouveau cépages résistant aux maladies. Expériences en Suisse romande et au Tessin. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 30: 347-351.
- Staudt, G. and Kassemeyer, H-H. 1995. Evaluation of Downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis*, 34: 225-228.
- Staudt, G. 1997. Evaluation of resistance to grapevine Downy mildew (*Uncinula necator*) in accessions of *Vitis* species. *Vitis*, 36: 151-154.

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza realizado para el área de cada una de las capas de tejido evaluado en hoja en los 11 clones.

PARÁMETROS		FUENTES DE VARIACIÓN			
		Clon	Año	C × A	Error
Cut+EpiSup	g.l. ¹	10	1	10	86
	C.M. ²	93519 NS ³	1623809 **** ⁴	66647 NS	112105
Empalizada	g.l.	10	1	10	86
	C.M.	3888447 NS	12461849 *	2016597 NS	1551466
Lagunar	g.l.	10	1	10	86
	C.M.	8549334 *	33619798 **	2296422 NS	3618363
Cut+EpiInf	g.l.	10	1	10	86
	C.M.	78593 NS	6271227 ***	90436 NS	71902

¹Grados de libertad; ²Cuadrados medios; ³No significativo; ⁴*, **, *** nivel de significación del 0,05; 0,01 y del 0,001 respectivamente; ⁵Interacción clon × año.

Tabla 2. Valores medios y Mínima Diferencia Significativa (MDS) para el área del parénquima lagunar en los diferentes clones.

CLONES	Área del Parénquima Lagunar (µm ²)
CSIC-1	12708,5 AB ¹
CSIC-2	12365,6 ABC
CSIC-3	11262,9 D
CSIC-4	13081,6 A
CSIC-5	11918,8 BCD
CSIC-6	11661,4 BCD
CSIC-7	11408,5 CD
CSIC-8	11642,0 BCD
CSIC-9	11614,9 CD
CSIC-10	11818,1 BCD
CSIC-11	11412,0 CD
MDS (0,05)	1081,3

¹Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna y cada carácter, no difieren significativamente.