

# INVESTIGACIONES

## IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL ANILLADO NECROTICO DE LOS PRUNUS (NRSV) MEDIANTE LA PRUEBA ELISA<sup>1</sup>

### Identification of Prunus Necrotic Ringspot Virus in Chile, by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Lucy Ascui M.<sup>2</sup> y Mario Alvarez A.<sup>3</sup>

#### SUMMARY

The double antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used for the specific detection and identification of Prunus Necrotic Ringspot Virus (NRSV). The material used for the test consisted of dormant buds, collected from cherries (*Prunus avium*), and seed obtained from *P. cerasus*, *P. persicae* and *P. cerasus* Stockton Morello. Seeds were tested germinated and not germinated.

The virus was detected in buds, where 13 trees out of 46 sampled, showed a positive reaction. The test also detected NRSV in non germinated seeds of *P. cerasus*, but not in germinated seeds; the test also failed to detect the virus in seeds, germinated or not, of Stockton Morello or *P. persicae*.

#### INTRODUCCION

Las enfermedades provocadas por virus constituyen mundialmente un serio problema en fruticultura, por las pérdidas que ocasionan en vigor y rendimiento y en calidad de la fruta.

Esta situación se agrava por el hecho que la mayoría de las especies frutales son propagadas asexualmente, lo que implica una gran dispersión de las enfermedades virales y, especialmente, aquéllas en que el patógeno además se transmite por semillas o polen.

Entre los virus de mayor prevalencia mundial está el "Prunus Ringspot Virus" (PRSV) o Virus del Anillado de los Prunus, el cual presenta varios "strains" o variantes, que causan diferentes enfermedades. Es el virus más común en las especies cultivadas de *Prunus* y algunas especies de Rosáceas (Nyland, Gilmer y Moore, 1976). Las primeras, en su mayoría, son susceptibles a uno o más variantes de PRSV.

Aunque se desconoce algún vector artrópodo, éste virus es transmitido por semilla (Cochran, 1946 y 1950), diseminado a través del polen (George y Davidson, 1963) y por propagación vegetativa de individuos infectados.

El PRSV es una seria enfermedad en viveros frutales, ocasionando pérdidas de yemas y púas de mala calidad y reduciendo el crecimiento de los árboles (Milbrath, 1950). Asimismo, reduce el crecimiento y el rendimiento de árboles en huertos adultos, así como la calidad de frutos, lo que es variable entre las especies (Parker y otros, 1959; Pine, 1964).

La variante corriente del PRSV, llamado el Prunus Necrotic Ringspot Virus (NRSV), produce típicamente en sus huéspedes "shock" o síntomas agudos inicialmente, seguido por recuperación y posterior ausencia de síntomas visuales obvios, (Nyland y otros, 1976).

En Chile, existen varios trabajos en los que se señala la presencia de enfermedades a virus afectando frutales y vides, pero basados principalmente en sintomatología (Krause, 1968). Así tenemos que Krause y otros (1970) señalan la presencia de PRSV o mancha anillada, en cerezos cv. Lambert y Bing, basándose en identificación visual.

<sup>1</sup> Recepción de originales: 26 de mayo de 1986.

<sup>2</sup> Sucesia 481, Santiago, Chile.

<sup>3</sup> Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar serológicamente la presencia de NRSV en Chile, en yemas en receso de *Prunus cersus* L. y semillas de *Prunus*, mediante la prueba serológica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

## MATERIALES Y METODOS

En los meses de julio y agosto de 1985, se recolectaron yemas de 46 árboles adultos de cerezo (*P. avium*), en siete huertos ubicados en la VII Región (Curicó y El Romeral) y la Región Metropolitana (Nos, Buin y Santiago), correspondientes a las variedades comerciales Lambert, Van, Corazón de Paloma, Republicana e Imperial.

Las yemas fueron secadas a temperatura ambiente, para su posterior análisis. El método de diagnóstico empleado fue el serológico de ELISA, descrito por Clark y Adams, 1977.

Semillas de duraznero cv. Pomona, guindo agrio común y del clon de *P. cerasus* Stockton Morello, provenientes de un vivero comercial, en dos estados de desarrollo, cerradas (sin inicios de germinación) y abiertas (con inicios de germinación), fueron incluidas en las pruebas de diagnóstico ELISA. Para cada uno de estos tres orígenes, se recolectaron 100 semillas, cerradas y abiertas, respectivamente. De cada uno de los seis lotes, se escogieron al azar 10 semillas, las que fueron analizadas individualmente.

Tanto el antisuero como el conjugado fueron adquiridos del Laboratorio ELISA, de la Universidad de Washington, a través del Dr. Gaylord Mink. La enzima del conjugado correspondía a fosfatasa alcalina tipo VII, del Laboratorio Sigma.

La globulina y globulina conjugada fueron diluidas al 1:1000, en sus respectivos "buffers". Las pruebas fueron realizadas en placas de poliestireno NUNC e incubadas con globulina en solución (pH = 9,6), por 16 hr a 8° C, aproximadamente. Las muestras de tejido fueron diluidas al 1:50 p/v, en buffer fosfato salino, que contenía 0,5 ml/lit de Tween 20 y 2% polivinilpirrolidona, permaneciendo en remojo durante toda la noche, para luego ser trituradas con un homogenizador Uita Turrax, a 24.000 rpm e incubadas en las placas, por 4 hr a 34° C.

La globulina conjugada, preparada en buffer fosfato salino con 0,05% Tween 20, 2% polivinilpirrolidona y 0,2% ovoalbúmina, fue incubada alrededor de 16 hr a 8° C.

El sustrato (p-nitrofenil fosfato, Sigma-104) fue adicionado a las placas a una concentración de 1 mg/ml, en solución con dietanolamina y azida de sodio, pH 9,8. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente, produciéndose cambio de color en las reacciones positivas, antes de 15 min. Las lecturas fueron realizadas entre los 45 a 90 min de agregado el sustrato, en un espectrofotómetro Baush and Lomb Spectronic 21, a DO405 nm.

Los testigos positivos y negativos a NRSV, también fueron proporcionados por el Dr. Mink y correspondieron, en ambos casos, a yemas de cerezo dulce y hojas de *Chenopodium quinoa*.

Se consideró una muestra positiva a NRSV, cuando el valor de lectura a espectrofotómetro DO405 nm fue, como mínimo, dos veces el valor de tejido sano.

Se establecieron tres grados de intensidad de color amarillo o de reacción en las muestras positivas a NRSV. La denominación empleada fue la siguiente: +++ = amarillo intenso; ++ = amarillo regular; + = amarillo leve.

Durante el mes de diciembre de 1985, se envió al Dr. Mink yemas en receso, conservadas en frío, obtenidas de árboles que habían resultado positivos a ELISA, para la identificación de los serotipos, ya que la enfermedad se presenta con síntomas desde casi imperceptibles hasta muy severos, siendo posible establecer relaciones serológicas entre distintas variantes, aun cuando presenten síntomas diferentes (Mink y otros, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Presencia de virus en yemas

De los siete huertos muestreados para el diagnóstico de NRSV en yemas de cerezo, sólo en cinco de ellos se encontraron árboles con reacción positiva. Los dos huertos restantes, ubicados en Buin y Santiago, respectivamente, correspondían a árboles jóvenes, de aproximadamente 6 años de edad y algunos de los individuos analizados eran injertados con material certificado introducido desde E.U.A.

Del total de 46 árboles en los cuales se efectuó ELISA en yemas en receso, 13 resultaron con valores de absorción sobre 0,9 (Cuadro 1). La amplia diferencia en valores de absorción entre tejido sano y enfermo, está relacionada directamente con el tipo de tejido analizado, en este caso yemas en receso. Mink (1980) señala que, al trabajar con tejido foliar o de fruto durante la

**CUADRO 1. Valor de absorbencia a 405 nm, de yemas de cerezo (*P. cerasus*) con reacción positiva al NRSV en prueba ELISA, provenientes de cinco variedades. Huertos Comerciales, Región Metropolitana y VI Región**

**TABLE 1. Absorbency values at 405 nm, of ELISA positive cherry (*P. cerasus*) buds to NRSV. Commercial orchards, Metropolitan Region and VI Region, Chile.**

Región	Localidad	Variedades	Prueba ELISA	
			Lectura espectrofotómetro	Intensidad reacción <sup>1</sup>
VI <sup>2</sup>	Curicó	Lambert	1,448	+++
	Romeral	Van	1,446	+++
	Curicó	C. de Paloma	1,513	+++
	Curicó	C. de Paloma	1,487	+++
	Curicó	Republicana	1,377	++
	Curicó	Republicana	1,293	++
	Curicó	Imperial	1,073	+
	Curicó	Imperial	1,054	+
	Romeral	No identificada	0,946	+
	Romeral	Lambert	1,409	++
	Metropolitana <sup>3</sup>	Nos	C. de Paloma	1,197
Nos		C. de Paloma	1,299	+++
Nos		C. de Paloma	1,391	+++

<sup>1</sup> Según intensidad de color amarillo: +++ = intenso; ++ = regular; + = leve.

<sup>2</sup> Los testigos sanos (hojas de *C. quinoa* y yemas de cerezo) presentaron valores DO de 0,389 y 0,397 respectivamente y ausencia de coloración amarilla. Los respectivos testigos enfermos, mostraron valores de 1,098 y 0,860, con intensidad de reacción leve.

<sup>3</sup> El testigo sano correspondió a hojas de *C. quinoa* y el enfermo a yemas de cerezo, con valores de DO 0,248 y ausencia de coloración amarilla y de 1,498 con reacción amarilla, respectivamente.

estación de crecimiento, se obtienen valores de lectura que varían notablemente, llegándose en muchos casos a valores de absorbencia sólo ligeramente superiores a los valores en tejido sano.

El Dr. Mink reconoció dos serotipos del material enviado para su identificación, utilizando la designación establecida para aislamiento de cerezos en Washington (Mink y otros, 1987).

El primero, aislado de árboles de cerezo cv. Black Republican y Corazón de Paloma, correspondería al serotipo CH-9, el cual varía ampliamente en su patogenicidad. Mink (comunicación personal) señala que: algunos serotipos CH-9 no producen síntomas visibles en cerezo; algunos sólo moderados círculos o puntos cloróticos en hojas, no afectando al fruto; y otros producen severas lesiones, como depresiones necróticas en la fruta y síntomas similares a tiro de munición, en hojas durante una temporada, para en años subsiguientes no manifestar síntomas. El segundo serotipo, proveniente del cv. Lambert, produjo síntomas en *C. quinoa* semejantes a una aislación designada como CH-71, la cual expresa severos síntomas en frutos (puntos necróticos más depresión del tejido) durante un solo año, pero no en años posteriores.

#### Presencia de virus en semilla

Sólo se detectaron semillas positivas a NRSV en la prueba ELISA, en cuatro de diez semillas de guindo agrio, sin inicios de germinación. Estas presentaron valores DO entre 0,702 y 1,041, con intensidad de reacción leve a intensa, respectivamente. El testigo enfermo (hoja de *C. quinoa*) presentó un valor DO de 0,997 e intensidad de reacción regular, en tanto que las hojas testigos sanas, mostraron valores promedio de 0,248 y ausencia de coloración amarilla. Ninguna de las otras especies ensayadas, el clon Stockton Morello y el duraznero, presentaron reacción positiva, cualquiera que fuera el estado de las semillas, al igual que la semilla germinada de guindo agrio.

Mink y Aichele (1984) señalan que la incidencia de NRSV es mayor en semilla no germinada, y por lo tanto, el efecto o porcentaje de infección de este virus es considerablemente más bajo en plantas de semillas, dado que éstas una vez infectadas no germinan o no producen plantas comercialmente aceptables.

Savio (1970) cita varios trabajos, en los que se señala que la contaminación de los patrones de semilla en cerezo (*P. avium* y *P. mahaleb*) no parece ser superior a un 10 a 15%, siendo todavía más baja en duraznero.

Probablemente, la difusión por polen entre árboles adultos, tiene gran importancia, especialmente en el

caso de cerezo, cuyas variedades autoestériles necesitan una polinización cruzada.

## RESUMEN

Se recolectaron yemas de cerezo (*Prunus avium* L.) durante el invierno de 1985 y semillas de *P. cerasus*, *P. persica* cv. Pomona y *P. cerasus* Stockton Morello. Las semillas fueron probadas germinadas y sin germinar.

Las muestras fueron probadas para la detección del virus del anillo necrótico de los prunus (Prunus Necrotic Ringspot Virus) a través de la prueba ELISA. De un

total de 46 árboles resultaron 13 con reacción positiva, con valores de lectura a espectrofotómetro DO405 nm superiores a 0,9.

Las pruebas de semilla, detectaron reacción positiva al virus en semillas no germinadas de *P. cerasus*, pero no en aquellas germinadas, ni del clon Stockton Morello, o de *P. persicae* (germinadas o no germinadas).

## LITERATURA CITADA

- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- COCHRAN, L.C. 1946. Passage of ring-spot virus through Mazzard cherry seeds. *Science* 104: 269-270.
- COCHRAN, L.C. 1950. Passage of the ring-spot virus through peach seed. *Phytopathology* 40: 964.
- GEORGE, J.A. and DAVIDSON, T.R. 1963. Pollen transmission of Necrotic Ring Spot and Sour Cherry Yellow viruses from tree to tree. *Can. J. Plant Sci.* 43: 276-288.
- KRAUSE, R. 1968. Enfermedades virósicas en manzanos y perales en Chile. *Revista de la Soc. Chilena de Fitopatología* 1(3): 1-5.
- KRAUSE, RAYMOND, OCHOA, MIRIAM, NYLAND, GEORGE y AUGER, JAIME. 1970. Estudios sintomatológicos preliminares de virosis en frutales de hoja caduca en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 30 (4): 215-217.
- MILBRATH, J.A. 1950. Latent Ring Spot virus of cherries reduces growth of nursery trees. *Plant Dis. Repr.* 34: 374-375.
- MINK, G.I. 1980. Identification of rugose mosaic-diseased cherry trees by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Plant Disease* 64: 691-694.
- MINK, G.I. and AICHELE, M.D. 1984. Detection of *Prunus* necrotic ring spot and prune dwarf viruses in *Prunus* seed and seedling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Plant Disease* 68: 368-381.
- MINK, G. I., HOWELL, W. E., COLE, A., and REGEV, S. 1987. Three serotypes of *Prunus* necrotic ringspot virus isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry trees in Washington. *Plant Disease* 71: 91-93.
- NYLAND, G., GILMER, R. M., and MOORE, J. D. 1976. Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America. *USDA. Agriculture Handbook* 437: 104-132.
- PARKER, K.G., BRASE, K.D., SCHMID, G., BARKSDALE, T.H., and ALLEN, W.R. 1959. Influence of ring spot virus on growth and yield of sour cherry. *Plant Dis. Repr.* 43: 380-384.
- PINE, T.S. 1964. Influence of Necrotic Ring Spot Virus on growth and yield of trees. *Phytopathology* 54: 604-605.
- SAVIO, A. 1970. Les taches annulaires des *Prunus* maladie a virus transmissible par pollen et graine. Prigonrieux, France, Centre Technique Interprofessionel des Fruits et Legumes Documents 26: 1-14.