

NOTAS

DETECCION DE LA ENFERMEDAD DE SHARKAS (PLUM POX VIRUS) EN UNA VIEJA COLECCION DE CAROZOS EN LA SUBESTACION EXPERIMENTAL LOS TILOS (INIA), CHILE¹

Detection of Sharkas disease (Plum pox virus) an old stone fruit collection at Los Tilos Experimental Substation (INIA), Chile

Guido Herrera M.²

SUMMARY

A survey was conducted during 1991/1992 season, aimed to identify the main virus diseases affecting stone fruits in Chile. Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and peach (*P. persica* L.) plants showing symptoms similar to those produced by plum pox virus (PPV) were detected in an old stone fruit collection at Los Tilos Experimental Substation (INIA).

This is the first record of the Sharka disease in Chile. The orchard where PPV was detected has been kept under observation and all the stone fruit trees were destroyed. PPV has not been found elsewhere.

Fruits of apricot cv. Bergeron showed chlorotic rings on the epidermal tissue and yellow rings in the stone. The leaves exhibited chlorotic rings. Peach plants cv. Springcrest showed yellow rings on the fruit epidermal tissue.

The presence of PPV was confirmed by the typical symptoms in the apricot and peach fruit, positive reaction against poly and monoclonal antibodies and decoloration of potyvirus particles by ISEM (immunosorbent electron microscopy).

Key words: virus, Plum pox virus, Sharkas, stone fruit, *Prunus armeniaca*, *Prunus persica*.

INTRODUCCION

La enfermedad de Sharkas, causada por el virus denominado Plum Pox Virus (PPV), es el principal problema de los frutales de carozo en Europa (Nemeth, 1993). Su importancia radica en que produce síntomas en los frutos, que impiden su comercialización, afecta un gran número de especies y presenta dificultades para su detección, debido a su distribución heterogénea en las plantas. Su propiedad de transmitirse por medio de áfidos, en forma no persistente, le permite al virus diseminarse rápidamente en una región.

Tras su aparición en Bulgaria, en 1915 (Atanosoff, 1932), el PPV se ha difundido por todos los países europeos con frutales de carozo (Nemeth, 1993).

También se le ha encontrado en los países ubicados en la zona oriental de Europa, tales como Turquía, Siria y Egipto (Nemeth, 1986). Hasta la fecha no ha sido encontrado en el continente americano.

En la Subestación Experimental Los Tilos se observaron durante la temporada 1991/92, plantas de damascos y durazneros con síntomas semejantes al PPV. El objetivo de la presente investigación fue identificar el virus causante de los síntomas.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras. En el verano de 1992, en un predio de la zona de Buin (Región Metropolitana), se colectaron frutos y hojas de plantas de damascos (*Prunus armeniaca* L.), cv. Bergeron y durazneros (*P. persica* L.), cv. Springcrest, que mostraban típicos síntomas de PPV. Los frutos de damascos presentaban anillos cloróticos en su superficie, manifestándose en su pulpa con un color blanquecino y con una dureza mayor que la consistencia de la pulpa normal (Foto 1). Las semillas

¹Recepción de originales: 27 de mayo de 1994.

El autor agradece la gentileza del Dr. Mariano Cambra. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), España, por facilitar numerosos antisuecos monoclonales.

²Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

mostraban anillos amarillos, rodeando una zona más oscura que a veces se impregnaba en la pulpa. Los síntomas en las hojas se manifestaron como anillos cloróticos, cuyo borde interno era definido, mientras el externo difuso (Foto 2). Las plantas de durazneros analizadas presentaban anillos cloróticos en la superficie de los frutos (Foto 3). En las reacciones serológicas y de microscopía electrónica, como controles sanos, se utilizaron durazneros cv. Nemaguard provenientes de cultivo de meristematos.



FOTO 1. Síntomas de Sharkas (Plum pox virus) en un fruto de damasco, cv. Bergeron.

PLATE 1. Symptoms of Sharkas (Plum pox virus) on a fruit of apricot, cv. Bergeron.



FOTO 2. Síntomas de Sharkas (Plum pox virus) en hojas de damasco, cv. Bergeron.

PLATE 2. Symptoms of Sharkas (Plum pox virus) on leaves of apricot, cv. Bergeron.



FOTO 3. Síntomas de Sharkas (Plum pox virus) en fruto de duraznero, cv. Springcrest.

PLATE 3. Symptoms of Sharkas (Plum pox virus) on a fruit of peach, cv. Springcrest.

Detección del PPV por Elisa. Cada muestra (fruto u hojas) de las diferentes especies, se trituró en bolsa de polietileno mediante un rodillo. El triturado así formado, se diluyó (1:5 p/v) en "buffer" de extracción (fosfato salino, pH 7,4, conteniendo 0,5 ml/L de Tween-20 y 20% de polivinil pirrolidona, PVP). Enseguida, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos. Las globulinas y globulinas conjugadas (comercializadas por SANOFI, Francia) se diluyeron 1:1.000 en sus respectivos buffers. Placas de poliestireno con la globulina se incubaron durante 2 horas a 36 °C. Posteriormente, se lavaron tres veces por 10 minutos cada vez con buffer de lavado (fosfato salino, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4) y se colocaron las respectivas muestras (antígenos), duplicadas en dos pocitos, durante toda la noche a 6 °C. Después de lavar se incluyeron las inmunoglobulinas conjugadas con fosfatasa alcalina durante 2 horas a 36 °C. El sustrato (p-nitrofenil fosfato, Sigma 104) se adicionó a las placas a razón de 1 mg/ml de dietanolamina, pH 9,8. Lecturas a los 30 y 60 minutos mostraron cambios en la intensidad de absorbancia en relación a los controles sanos. Se consideró como muestras positivas aquellas que presentaban una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos.

En el caso de la utilización de sueros monoclonales se procedió de la siguiente manera: placas de polistereno se activaron con 100 µl de suero policlonal en una dilución de 1:1.000 en buffer de cobertura (carbonato de sodio 1,59 g, bicarbonato de sodio 2,93 g por L de agua, pH 9,6) e incubadas a 4 °C por toda la noche. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces por 10 minutos, en buffer de lavado (8,0 g de cloruro de sodio, 0,20 g de cloruro

de potasio, 3,0 g de trizma base en 1 litro de agua, pH 7,4). Enseguida, las placas se bloquearon con solución bloqueadora (5,0 g leche descremada, 2,5 g de bovine serum albumina (BSA) en 500 ml de buffer de lavado), por una hora a temperatura ambiente. Se lavó igual que en el proceso anterior y se agregaron 100 µl de muestra o antígeno (trituras en buffer de extracción (1,59 g de carbonato de sodio, 2,93 g de bicarbonato de potasio, 10 g de polivinil pirrolidona (PVP), 2,0 g de DIECA (diethyltiocarbamato), pH 9,6 diluido en 1 litro de agua)), las cuales se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Después del respectivo lavado se agregaron 100 µl de sueros monoclonales (gentilmente enviados por Dr. M. Cambra, IVIA, España) diluidos en buffer de bloqueo e incubados a 4 °C durante toda la noche. Los cuatro sueros monoclonales utilizados: 5 B, 4 DB, 12 EB y DG 5 reaccionan con la mayoría de las razas presentes en Europa (Cambra, IVIA, comunicación personal). Después del respectivo lavado de las placas, se agregó anti rata generado en cabra (Sigma) en dilución de 1:100 en buffer de bloqueo incubado a 32 °C durante 5 horas. Después de agregar el sustrato (p-nitrofenilfosfato) las placas se leyeron en un lector Elisa a 405 nm.

Detección del PPV por microscopio electrónico específico (ISEM). Las grillas de microscopía electrónica con membrana de colodión, se activaron colocándolas en una gota de IgG, diluido 1:1.000

en fosfato buffer, pH 6,5 ("ISEM buffer"), por 2 horas a 36 °C. Posteriormente, las grillas se lavaron colocándolas por 15 minutos en una gota de ISEM buffer, tres veces. Enseguida, se agregó la muestra haciendo flotar las grillas en una gota de extracto de planta. El extracto de planta se preparó triturando en un mortero 1 g de tejido proveniente de fruto con síntomas diluido 1:10 en ISEM buffer y centrifugado por 5 minutos a 2.000 rpm. Los primeros 25 µl de la superficie se usaron como muestra. El material así preparado se incubó por 2 horas a 36 °C. Las grillas se lavaron haciendo escurrir sobre ellas, 20 gotas de ISEM buffer. La tinción se realizó con fosfotungstato de sodio (KPT) al 2% en agua destilada, escurriendo 10 gotas sobre la grilla.

RESULTADOS

En las pruebas Elisa, las hojas y frutos provenientes de plantas de damascos y durazneros que mostraban la típica sintomatología del PPV, reaccionaron positivamente a los sueros policlonales y a los cuatro sueros monoclonales (Cuadro 1). Tejidos de las mismas especies, pero sanos, no reaccionaron a los antisueros utilizados. Estos resultados fueron confirmados por la observación en frutos con síntomas de partículas filamentosas de aproximadamente 720 nm de largo por 30 nm de ancho y decoradas con antisuero del PPV bajo el microscopio electrónico (Foto 4).

CUADRO 1. Valores de absorbancia (405 nm) en pruebas Elisa de muestras de hojas y frutos de damascos y durazneros a antisueros poli y monoclonales del Plum pox virus.
Cifras representan un promedio de cinco muestras

TABLE 1. Absorbance values (405 nm) of ELISA tests in apricot and peach samples against poly and monoclonal antibodies of Plum pox virus

Antisuero	Damasco		Duraznero		Control sano	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
Policlonal						
SANOFI	0,856	0,978	0,789	0,356	0,020	0,030
Monoclonales¹						
5 B	0,345	0,289	0,989	0,789	0,009	0,018
4 DB 12	0,456	0,567	0,666	0,349	0,010	0,015
1 EB 6	0,120	0,117	0,145	0,167	0,016	0,011
4 DG 5	0,234	0,233	0,217	0,278	0,023	0,029

¹Sueros donados por Dr. Mariano Cambra. IVIA. Valencia, España.

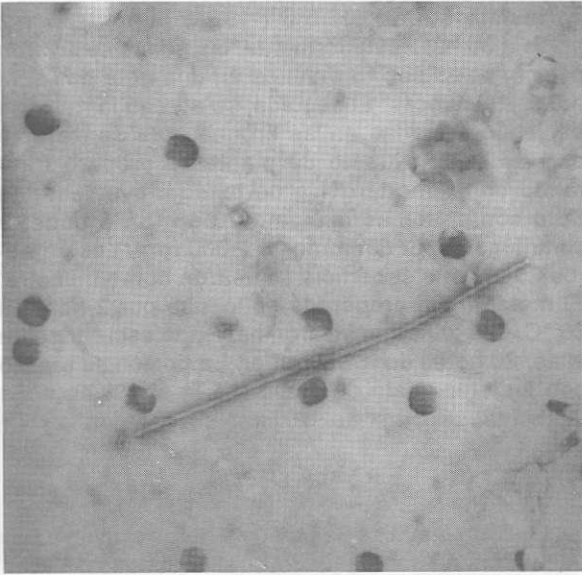


FOTO 4. Partícula de virus en extracto de fruto de duraznero, cv. Springcrest, detectado por el microscopio electrónico inmuno-específico (ISEM).

PLATE 4. Virus particle from peach fruit, cv. Springcrest detected by immunosorbent electron microscopy (ISEM).

DISCUSION

La presencia de síntomas típicos del PPV en las plantas de damascos y durazneros, su reacción serológica a antisueros poli y monoclonales del PPV

y la observación de partículas tipo potyvirus (filamentosas y de aproximadamente 720 x 30 nm), decoradas con antisuero del PPV, confirman, en un alto grado, la presencia del virus en las plantas afectadas.

El PPV se consideraba, hasta recientemente, el único potyvirus afectando a frutales de carozo. Sin embargo, Hadidi y Levy (1993) señalaron la presencia de un *Prunus Latent Potyvirus* y sugieren que antisueros policlonales pueden reaccionar con un número variable de potyvirus. Considerando, las reacciones positivas iniciales del aislamiento chileno del PPV a antisueros policlonales, las muestras se compararon a los sueros monoclonales generados en España. Los resultados confirmaron la presencia del PPV en las plantas afectadas y descartaron la posibilidad de interacciones con otros potyvirus.

A la fecha, la experiencia con el PPV había estado restringida al continente europeo, ésta es la primera mención de la presencia del virus en el continente americano. El huerto donde se detectó la enfermedad se mantiene bajo observación y todas las plantas de carozo fueron eliminadas. Síntomas semejantes a los causados por el PPV no han sido encontrados en otras partes del país. Actualmente, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile, realiza prospecciones para determinar el grado de dispersión de la enfermedad. Asimismo, ha declarado el control obligatorio de la enfermedad de Sharkas en todo el territorio nacional (MINAGRI, 1994).

RESUMEN

En una prospección realizada durante la temporada 1991/92, para identificar las principales enfermedades causadas por virus en frutales de carozo en Chile, se encontraron plantas de damascos y durazneros que mostraban síntomas semejantes a los causados por la enfermedad de Sharkas (*Plum pox virus*, PPV), en una colección de la Subestación Experimental Los Tilos (INIA).

Frutos de damasco, cv. Bergeron, mostraban anillos cloróticos en la epidermis y anillos amarillos en la superficie del carozo. Las hojas exhibían anillos cloróticos. Los frutos de plantas de duraznero, cv. Springcrest, presentaban anillos cloróticos en su superficie.

La presencia de síntomas típicos del PPV en las plantas de damascos y durazneros, su reacción serológica a antisueros poli y monoclonales del PPV, y la observación de partículas tipo potyvirus decoradas con antisuero de PPV, confirman la presencia del PPV en las plantas afectadas.

Es la primera mención de la enfermedad de Sharkas en Chile. El huerto donde se encontró la enfermedad está bajo observación y todas las plantas de carozo destruidas.

Palabras claves: Virus, Plum pox virus, Sharkas, frutales de carozo, *Prunus armeniaca*, *Prunus persica*.

LITERATURA CITADA

-
- ATANOSIFF, D. 1932. Sarka po slivite, edna nova virus a bolest. Jb. Univ. Sofia. Agronom. Fak. 11: 49-70.
- HADIDI, A. and LEVY, L. 1993. Accurate identification of Plum Pox Virus and its differentiation from Prunus Latent Potyvirus in *Prunus* germoplasm. In: European and Mediterranean Plant Protection Organization. Conference on Plum Pox Virus. 5-8 August 1993. Bordeaux. Francia. p.: 37.
- NEMETH, M. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Kluwer Academic Publishers. USA. 840 p.
- NEMETH, M. 1993. History and importance of Plum Pox Virus in stone fruit production. In: European and Mediterranean Plant Protection Organization. Conference on Plum Pox Virus. 5-8 August 1993. Bordeaux. Francia. p.: 9.
- MINAGRI-MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1994. Servicio Agrícola y Ganadero establece el control obligatorio de la plaga de los vegetales que indica en todo el territorio nacional y establece medidas de carácter obligatorio. Diario Oficial N° 34.843: 2.