

DISEMINACIÓN NATURAL DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE SHARKA (*Plum pox virus*, PPV) EN TRES TEMPORADAS EN UN HUERTO DE DAMASCO¹

Natural spread of the virus causing Sharka disease (*Plum pox virus*, PPV) during three seasons in an apricot orchard¹

Guido Herrera M.^{2*} y Mónica Madariaga V.²

ABSTRACT

The spread of *Plum pox virus* (PPV) was studied in an apricot (*Prunus armeniaca* L.) orchard established with healthy material in 1995 in the Metropolitan Region of Chile. The orchard was established in an area with high inoculum pressure with three cultivars: Dina, Castelbrite and Katy. The assessment of the trees was made every year by observation of symptoms and using policlonal antibodies for PPV. The strain found in the orchard was PPV-D (Dideron). Differences in the rate of PPV spread were observed among the cultivars. The spread of PPV in 1999, 2000 and 2001 was 6.6, 14.1 and 26.7%; 0, 0.6 and 3.3%; and 0, 0.5, and 2.1% for cvs. Dina, Castelbrite and Katy, respectively.

Key words: epidemiology, *Prunus armeniaca* L., Sharka disease.

RESUMEN

La diseminación de *Plum pox virus* (PPV) fue estudiada en un huerto de damascos (*Prunus armeniaca* L.) establecido en 1995 con material sano en la Región Metropolitana de Chile. El huerto fue establecido en un área con una alta presión de inóculo con tres cultivares: Dina, Castelbrite y Katy. La evaluación de los árboles se realizó cada año mediante la observación de síntomas y el uso de antisueros policlonales para PPV. La raza presente en el huerto fue del tipo D (Dideron). La diseminación de PPV en los años 1999, 2000 y 2001 fue 6,6; 14,1 y 26,7%; 0; 0,6 y 3,3%; 0; 0,5 y 2,1% para los cvs. Dina, Castelbrite y Katy, respectivamente.

Palabras clave: epidemiología, *Prunus armeniaca* L., enfermedad de Sharka.

INTRODUCCIÓN

Los síntomas del *Plum pox virus* (PPV) fueron observados por primera vez en huertos de ciruelos (*Prunus domestica* L.) en Bulgaria, entre los años 1915 y 1918. Sin embargo, la naturaleza viral del problema se definió en 1932 por Atanosoff (1932), quién la denominó “enfermedad de Sharka”. Entre los años 1932 y 1960, el agente viroso se desplazó infectando huertos de ciruelos y damascos (*Prunus armeniaca* L.) en Yugoslavia, Hungría, Rumania, Albania, Checoslovaquia, Alemania y Rusia. Posteriormente, en la década de 1970, se diseminó a Holanda, Francia e Italia, no sólo en ciruelos y damascos, sino también se le observó en durazneros (*Prunus persica* L.). España y Portugal fueron infectados en la década de 1980 (Llacer y Cambra, 1998). Más tarde se detectó en Chile en 1992 (Herrera, 1994), India en 1994 (Bhardwaj *et al.*, 1995), en EE.UU. en 1999 (Milius, 1999) y en Canadá en 2000 (CFI, 2000).

En Chile se le identificó en 1992 en una vieja colección de frutales de carozo en la zona central del país (Herrera, 1994). Posteriormente, en las temporadas 1995, 1996 y 1997, prospecciones serológicas del virus realizadas en las regiones IV, V, VI y Región Metropolitana, donde se cultivan los carozos, determinaron una incidencia a nivel nacional de 15%, en un total de más de 10.000 plantas analizadas en tres temporadas de cultivo (Herrera *et al.*, 1998). Bajo las condiciones chilenas el virus se encontró infectando damascos,

¹Recepción originales: 22 de enero de 2002.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
E-mail: gherrera@platina.inia.cl *Autor para correspondencia.

durazneros (*Prunus persica* L.), nectarines (*Prunus persica* var. *nectarina* L.), ciruelos y almendros (*Prunus dulcis* L.). Estudios más detallados del virus demostraron la presencia de la raza "D" (Dideron) (Rosales *et al.*, 1998). Aun cuando la distribución del virus en Chile incluye desde la IV a la VI regiones, la manifestación de los síntomas en las plantas frutales ha sido diferente a lo ocurrido en Europa. Síntomas evidentes en los frutos se han detectado sólo alrededor de la Región Metropolitana. En el resto del país, aunque se encuentran plantas serológicamente positivas, ellas no han mostrado síntomas en las últimas temporadas (Herrera y Madariaga, 2002). Estos aislamientos fueron estudiados molecularmente por Reyes *et al.* (2001), encontrando ciertas diferencias de estos aislamientos respecto del aislamiento tipo D.

Desde la identificación de la enfermedad en Chile (Herrera, 1994), se ha estudiado la distribución de PPV en huertos de carozo (Herrera *et al.*, 1998), y en viveros comerciales (Herrera y Madariaga, 2002) las razas del virus (Rosales *et al.*, 1998) y características moleculares (Reyes *et al.*, 2001). Sin embargo, no existen datos respecto de los grados de diseminación del virus dentro de los huertos infectados. El objetivo de esta investigación fue determinar el aumento en el número de plantas con síntomas de PPV en un huerto de damasco a partir de la temporada 1998.

MATERIALES Y MÉTODOS

El huerto de damasco en estudio estaba ubicado en la comuna de Nos, Región Metropolitana. El huerto plantado en 1995 incluía tres cultivares: Dina (1.218 plantas), Castelbrite (957 plantas) y Katy (870 plantas). A partir de 1999, plantas de la variedad Dina mostraron los típicos síntomas de PPV consistentes en argollas cloróticas en la superficie de los frutos. Las pruebas inmunológicas con suero monoclonal denominado 5B por Asensio (1996) y moleculares con iniciadores específicos para las diferentes razas del virus indicaron la presencia de la raza D (Dideron) (resultados no mostrados) en las plantas infectadas.

Se utilizaron dos técnicas para evaluar la diseminación anual de PPV en los huertos: ELISA y

sintomatología. La identificación de plantas con síntomas se realizó una semana antes de la cosecha mediante la observación individual de los frutos de cada planta. Se estableció como planta enferma aquellas que mostraban a lo menos un fruto con argollas cloróticas en la superficie de los frutos. La identificación de plantas contaminadas con PPV mediante ELISA se realizó colectando 4 submuestras por planta (brotes y hojas nuevas), cada una obtenida de acuerdo a la orientación de los cardinales. Las muestras colectadas se mantuvieron en un contenedor con temperatura regulada a 15–20°C hasta su procesamiento.

Para la ejecución de la prueba ELISA se siguió la metodología descrita por Herrera (1994) y Herrera y Madariaga (2002). Para ello, con un rodillo manual se trituró aproximadamente 1 g de hojas y brotes nuevos, se diluyó (1/10 p/v) en tampón de extracción (Na_2CO_3 1,5 mM, NaHCO_3 3,5 mM, pH 9,6). Luego, las muestras se centrifugaron a 2,875 g durante 5 min. En placas de poliestireno se adicionaron 100 μL del sobrenadante por muestra (antígeno) a cada celda, incluyendo siempre una repetición (dos celdas), la placa se incubó bajo condiciones de refrigeración (4°C) por una noche. Luego, las placas se lavaron con solución de lavado PBST (NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8,09 mM, KCl 2,68 mM y 0,05% Tween-20) cinco veces, cada vez durante 5 min. Luego, se adicionaron 100 μL de solución de bloqueo albúmina de huevo al 3% en PBS 1X (NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8,09 mM, y KCl 2,68 mM) incubándose durante 2 h a 37°C. Después de un lavado similar a los anteriores, se agregaron 100 μL de las inmunoglobulinas policlonales (SANOFI, Francia) diluidas en tampón de molienda (Albúmina de bovino 0,2% y PVP-40 2% en PBS 1X), incubándose durante 3 h a 37°C. Posteriormente, se incorporó el segundo anticuerpo producido en cabra (Sigma 104, St. Louis, Missouri, USA) y conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, incubándose las placas toda la noche a 4°C. Finalmente, después de lavar, la reacción se reveló adicionando 1 mg mL^{-1} de p-nitrofenilfosfato en tampón de dietanolamina. Las reacciones inmunológicas se evaluaron en un lector ELISA (Bio Kinetic EL-312e, EE.UU.), considerando como muestras positivas, todas aquellas

superiores al doble del valor de absorbancia de los controles sanos.

RESULTADOS

Número de plantas con síntomas por temporada

En el Cuadro 1 se muestran los resultados del número de plantas con síntomas en los frutos para cada variedad y año. Debido a que el predio está ubicado en una zona donde se detectó la enfermedad por primera vez en 1992, a partir de 1998 se observaron anualmente los frutos de las plantas en forma meticulosa. Ninguna de las variedades presentó plantas con síntomas durante la temporada 1998. La primera variedad en presentar plantas con los síntomas típicos de PPV fue Dina en la temporada 1999, en 6,6% de las plantas. En la temporada siguiente, la sintomatología se observó en Castelbrite (0,6%) y Katy (0,5%). Mientras que en Dina nuevas plantas aparecieron con sín-

tomas, es así como, se observaron otras 7,4% de plantas con síntomas en los frutos, que sumados a las plantas afectadas en la temporada anterior, totalizó un porcentaje de 14,1%. En la temporada 2001, los porcentajes de plantas con síntomas aumentaron en todas las variedades. En Dina se presentaron otras 154 plantas contaminadas (12,6%) alcanzando en las tres temporadas a 26,7%. De igual forma, aumentaron los porcentajes de plantas afectadas en Castelbrite y Katy.

Número de plantas ELISA positivo

En el Cuadro 1 se muestra el número y porcentajes de plantas ELISA positivo en las temporadas 2000 y 2001. En todas las variedades los porcentajes de plantas serológicamente positivas aumentaron desde la temporada 2000 a la 2001. Mientras Dina aumentó de 4,4 a 24,2%, Castelbrite lo hizo de 1,5 a 25,0% y Katy de 4,7 a 21,9%.

Cuadro 1. Número de plantas ELISA positivo y número de plantas mostrando síntomas de *Plum pox virus* en los frutos en tres cultivares de damascos entre las temporadas 1998 y 2001
Table 1. Number of ELISA positive plants and number of plants having *Plum pox virus* symptoms on the fruit of three apricot cultivars between the 1998 and 2001 growing seasons

Variedades	Variables	Total de plantas	Temporadas			
			1998	1999	2000	2001
Dina	ELISA positivo	1.218	n.a. ¹	n.a.	89 (7,31) ²	295 (24,2)
	Número de plantas con síntomas en frutos	1.218	0 (0,0)	81 (6,6)	91 (7,4)	154 (12,6)
	Número acumulado anual de plantas con síntomas en frutos	1.218	0 (0,0)	81 (6,6)	172 (14,1)	326 (26,7)
Castelbrite	ELISA positivo	957	n.a.	n.a.	15 (1,5)	240 (25,0)
	Número de plantas con síntomas en frutos	957	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (0,6)	26 (2,7)
	Número acumulado anual de plantas con síntomas en frutos	957	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (0,6)	32 (3,3)
Katy	ELISA positivo	870	n.a.	n.a.	41 (4,7)	191 (21,9)
	Número de plantas con síntomas en frutos	870	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (0,5)	14 (1,6)
	Número acumulado anual de plantas con síntomas en frutos	870	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (0,5)	19 (2,1)

¹ n.a.: no analizado.
² (), porcentajes respecto del total de plantas del cultivar.

Aumento anual de plantas mostrando síntomas en los frutos

En el Cuadro 1 se muestra el aumento anual de plantas con síntomas en los frutos en cada una de las variedades en las tres temporadas de estudio. En la variedad Dina el porcentaje de plantas con síntomas progresó más rápido que en las variedades Castelbrite y Katy. Así, en esta variedad PPV progresó desde 0% en 1998 a 6,6% en 1999, 14,1% en 2000 y 26,7% en 2001. Castelbrite y Katy llegaron a valores máximos de plantas con síntomas de 3,3 y 2,1%, respectivamente, en la última temporada estudiada.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se estableció que en el cultivar Dina el número de plantas con síntomas aumentó en un lapso de cuatro años en un 26,7%. Estos resultados indican un grado de diseminación de PPV más lento que lo descrito por Llacer *et al.* (1992) para España, donde se requieren de 2 a 5 años para lograr un 100% de diseminación. Por otro lado, estudios realizados en Francia por Adamolle *et al.* (1994) indicaron períodos de 8-9 años para llegar a infecciones del 100% de las plantas.

Desde el punto de vista epidemiológico, varios son los factores que determinan la velocidad de diseminación de los patógenos. Al respecto, trabajos realizados en Grecia indican que la velocidad de diseminación de PPV depende fundamentalmente de la cantidad de áfidos virulíferos y de la cercanía de las fuentes de inóculo (Varveri *et al.*, 2001).

No obstante lo anterior, Gottwald *et al.*, (1995) cuestionaron los estudios epidemiológicos basados en expresión de síntomas más que en detecciones serológicas, puesto que no consideran los períodos de latencia de la enfermedad. En la presente investigación, el cultivar Dina presentó un total de 26,7% de plantas con síntomas al cabo de cuatro años, pero en la última temporada se detectó otro 24,2%, que aun cuando contenía el PPV, todavía no expresaba los síntomas. En tal caso, el total de infección de la enfermedad considerando plantas con síntomas y aquellas en período de latencia alcanzó a 50,9%. Cabe hacer notar también que

los cultivares Castelbrite y Katy presentaron en la temporada 2001 un porcentaje total de plantas con síntomas más bajo que Dina. Sin embargo, los porcentajes de plantas serológicamente positivas no difirieron de aquellos encontrados en el cv. Dina. Esto sugiere que tanto en los cvs. Castelbrite como Katy gran parte de las plantas infectadas estaban en su período de latencia, y debería esperarse un aumento en el número de plantas mostrando los síntomas en los años sucesivos.

En la presente investigación se observaron diferencias en la diseminación anual de PPV en tres cultivares de damascos. Mientras en el cultivar Dina el PPV se diseminó rápidamente alcanzando 26,7% de plantas con síntomas al cuarto año de observación, en Castelbrite y Katy la diseminación tuvo un grado inferior, llegando a 3,3 y 2,1%, respectivamente, al cuarto año. Esta diferencia podría ser explicada por un mayor grado de resistencia y/o tolerancia a la enfermedad de estas variedades, o bien, por razones de la propia epidemiología de la enfermedad. Al respecto, otros estudios de los autores (no publicados) encontraron que huertos del cv. Katy de 3 años de edad presentaban niveles de plantas con síntomas de 14%, sugiriendo, por la rapidez de aparición de síntomas, una falta de resistencia y/o tolerancia del cultivar a la infección de PPV. Por otro lado, los primeros síntomas de PPV se observaron en el cultivar Dina en la temporada 1999 (6,6%), posteriormente, en 2001 aparecieron en Castelbrite (0,6%) y Katy (0,5%). Por lo tanto, hace suponer que el PPV llegó desde otros lugares al cultivar Dina, y desde él el virus comenzó a diseminarse localmente a otros cultivares debido a la ubicación de éstos a favor del viento.

Los resultados de la presente investigación son una primera aproximación respecto de la epidemiología de PPV bajo nuestras condiciones. El virus fue identificado por primera vez en Chile en 1992 (Herrera, 1994), desde esta fecha hasta finales de la década de los 90, aun cuando se detectó serológicamente PPV a nivel nacional, la enfermedad no se expresó en todo su potencial (Herrera *et al.*, 1998). La información entregada en el presente trabajo sugiere que a lo menos en el huerto estudiado, están dados complejo de factores que con-

tribuyen a la expresión máxima de PPV. Los resultados enfatizan la necesidad de estudiar otros aspectos epidemiológicos de la enfermedad en Chile, tales como especies de áfidos que diseminan PPV, su dinámica poblacional y su eficiencia de transmisión del virus.

CONCLUSIONES

El número de plantas de damascos con síntomas de la enfermedad de Sharka (*Plum pox virus*) en los frutos aumentó en cuatro temporadas en 26,7% en el cultivar Dina, 3,3% en Castelbrite y 2,1% en Katy.

LITERATURA CITADA

- Adamolle, C., M. Boeglin, G. Labonne, T. Candresse, et J.B. Quiot. 1994. Une souche negrogene du *Plum pox virus* provoque un deperissement sur certains cultivars de pecher. European Plant Protection Organization (EPPO). Bull. 24:721-730.
- Asensio, M. 1996. El virus de la Sharka (*Plum pox virus*); caracterización, diagnóstico y detección mediante anticuerpos monoclonales específicos. 184 p. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Valenciano, Valencia, España.
- Atanosoff, D. 1932. Sarka po slivite, edna nova virus a bolest. Jb Univ. Sofia. Agron. Fak. 11:49-70.
- Bhardwaj, S., P. Thakur, K. Kohosla and D. Sharma. 1995. Detection of *Plum pox virus* in India. Acta Hort. 386:237-241.
- CFI. 2000. *Plum pox virus* update. Canadian Food Inspection Agency. Available at <http://www.cfia-acia.agr.ca>. Accessed November, 2000.
- Gottwald, T., L. Avinent, G. Llacer, A. Hermoso de Mendoza, and M. Cambra. 1995. Analysis of the spatial spread of Sharka in apricot and peaches orchards in Eastern Spain. Plant Dis. 79:266-278.
- Herrera, M.G. 1994. Detección de la enfermedad de Sharka (*Plum pox virus*) en una vieja colección de carozos en la Sub Estación Experimental Los Tilos. Agricultura Técnica (Chile) 54:187-191.
- Herrera, M.G., y M. Madariaga. 2002. Incidencia de los virus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Plum pox virus* (PPV) en viveros de frutales de carozo en la zona central de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 62:38-45.
- Herrera, M.G., P. Sepúlveda, and M. Madariaga. 1998. Survey of Sharka disease (*Plum pox virus*) on stone fruit in Chile. Acta Hort. 472:393-399.
- Llacer, G., L. Avinent, and A. Hermoso de Mendoza. 1998. Epidemiology of *Plum pox virus* in Valencia. Acta Hort. 472:266-278.
- Llacer, G., and M. Cambra. 1998. Thirteen years of Sharka diseases in Valencia, Spain. Acta Hort. 472:379-384.
- Milius, S. 1999. First *Plum pox virus* up in North America. Science News 156:325.
- Reyes, F., A. Reyes, P. Sepúlveda, G. Herrera, P. Hinrichsen, and H. Prieto. 2001. New insights on *Plum pox virus* in Chile. Acta Hort. 550:135-140.
- Rosales, M., P. Hinrichsen, and G. Herrera. 1998. Molecular characterization of *Plum pox virus* isolated from apricots, plums and peaches in Chile. Acta Hort. 472:401-405.
- Varveri, C., D. Dimou, E. Zintzaras, and B. Di Terlezzi. 2001. Monitoring and spatiotemporal analysis of PPV-M spread in two apricot orchards in Southern Greece. Acta Hort. 550:129-131.