

CAPÍTULO 5

Frutales de carozo

Plum pox virus (Sharka)

Marini, D.; Rossini, M.; Dal Zotto, A.; Porcel, L. y L. Arroyo

110	<i>Introducción</i>
110	<i>Nombre del agente y sinonimias</i>
111	<i>Hospedantes</i>
111	<i>Sintomatología</i>
111	<i>Ciruelos</i>
111	<i>Damascos</i>
112	<i>Durazneros y nectarinos</i>
112	<i>Distribución en el país</i>
112	<i>Epidemiología</i>
112	<i>Transmisión</i>
114	<i>Periodo de incubación</i>
114	<i>Distribución espacial y temporal de la enfermedad</i>
117	<i>Técnicas de detección</i>
117	<i>Inspección visual</i>
117	<i>Test biológicos</i>
117	<i>Test serológicos</i>
120	<i>Test moleculares</i>
121	<i>Manejo de la enfermedad</i>
123	<i>Monitoreo</i>
123	<i>Análisis de plantas madre del género Prunus</i>
125	<i>Bibliografía</i>

Introducción

La enfermedad del sharka, causada por el *Plum pox virus* (PPV), es considerada la virosis más importante que afecta a los frutales de carozo en términos de impacto económico y agronómico (Németh, 1986). Fue descrita por primera vez en ciruelos (*Prunus salicina* L.) en 1917 y en damascos (*Prunus armeniaca* L.) en 1933 en Bulgaria (Atanasoff, 1932; 1935). Al principio la enfermedad se difundió lentamente por toda Europa del este, luego comenzó a difundirse más rápidamente detectándose en Francia en 1970 y en España en 1984. Sin embargo, recién en el año 1992 el virus se detectó en el continente americano, describiéndose en la zona central de Chile. En 1998 fue detectado en Estados Unidos y en el 2000 en Canadá (Herrera, 1994; Levy *et al.*, 2000a; Thompson *et al.*, 2001). También ha sido detectado en Egipto, India, China, Irán, Kazakhsan, Pakistán y Japón (Mazyad *et al.*, 1992; Bhardwaj *et al.*, 1995; Navratil *et al.*, 2006; Capote *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2010; Fujiwara *et al.*, 2011).

En Argentina esta enfermedad fue detectada por primera vez en diciembre de 2004 en el departamento de Pocito, provincia de San Juan, en plantas de damasco y ciruelo japonés (Dal Zotto *et al.*, 2006). Las plantas afectadas fueron erradicadas en una acción conjunta de los organismos provinciales y nacionales de control de sanidad vegetal y los productores frutícolas involucrados.

El sharka constituye la virosis más importante del cultivo del género *Prunus*. En los últimos 30 años ha significado un gasto de más de 13 billones de dólares en todo el mundo. En muchos países los frutos infectados son rechazados para consumo interno, no pueden ser exportados o no son aceptados por la industria dado el sabor amargo que la enfermedad les produce. La limitación también puede extenderse a la exportación de material vegetal de multiplicación como yemas y portainjertos dado que los países compradores necesitan asegurarse de la sanidad del material a importar con la finalidad de evitar el ingreso del sharka. En general la enfermedad es considerada grave por varios

factores: la rápida diseminación por vectores, el severo daño que produce sobre los frutos que los hace no comercializables y que la mayoría de los cultivares comerciales disponibles son susceptibles. A ello debe agregarse que como todas las virosis que afectan a las plantas, no disponen de un método de control eficiente y que su diagnóstico presenta dificultades dada la distribución irregular del virus en la planta (Cambra *et al.*, 2006).

Nombre del agente y sinonimias

Es producida por un virus del género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*, el *Plum pox virus*. Es el único *Potyvirus* que infecta al género *Prunus*. La enfermedad también es conocida como “Viruela del ciruelo” y el virus como “Virus del sharka” (Németh, 1986).

En la actualidad, este virus presenta siete razas: PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus), PPV-EA (El Amar), PPV-C (Cherry), PPV-REC (Recombinante), PPV-W (Winona) (Gildow, 2001) y PPV-T (Serce *et al.*, 2009). La raza presente en Argentina es la del tipo D (Dal Zotto *et al.*, 2006). PPV-D fue aislada por primera vez en Francia, es la más común en Europa, Sudamérica y EEUU. Esta raza se caracteriza por no ser transmitida por semillas, afecta con igual grado de severidad a ciruelos y damascos, y es menos agresiva en durazneros [*Prunus persica* (L.) Batsch] y nectarinos [*P. persica* (L.) Batsch *nucipersica* (Suchow) C. K. Schneid]. Debido a su difícil transmisión a hospedantes experimentales y su baja eficiencia de propagación por vectores es considerada como una forma no epidémica de PPV (Levy *et al.*, 2000b).

La raza M es la más agresiva se dispersa rápidamente por pulgones, afecta principalmente duraznero y nectarino y, en menor proporción, ciruelo y damasco. No está citada en América, es endémica del sudeste de Europa. La raza EA sólo ha sido identificada en el norte de África. Afecta damasco y, en menor proporción, ciruelo, duraznero y nectarino. La raza C ha sido detectada solamente en Europa, en cerezo (*P. avium* L.) y guindo (*P. cerasus* L.); mientras que la raza W fue aislada en ciruelo europeo (*P. domestica* L.) en Canadá, y recientemente en Latvia, Ucrania

y Rusia, no se tiene información sobre su agresividad (Sheveleva *et al.*, 2012). La raza rec se da en muchos países de Europa del centro y del este. Se comporta de forma similar a la raza D. Por último, la raza T fue aislada en Ankara, Turquía, en damascos y ciruelos en el 2009 (Serce *et al.*, 2009).

Recientemente, se han propuesto dos nuevas razas, PPV-CR (Cherry Russia) aislado en antiguas plantaciones de guindos en Rusia y PPV-AN (Ancestor) aislado en ciruelos japoneses en Albania (Glasa *et al.*, 2012; Palmisano *et al.*, 2012).

Hospedantes

PPV infecta bajo condiciones naturales árboles frutales del género *Prunus* (cultivares comerciales y portainjertos): damasco, ciruelo europeo, ciruelo japonés, duraznero, nectarinos, cerezo ácido y dulce, almendro (*Prunus dulcis*, Mill.), *Prunus davidiana*, Mahaleb (*P. mahaleb*), Mariana (*P. marianna*) y Myrabolán (*P. cerasifera*); entre otras. El virus también infecta a especies ornamentales de *Prunus* tales como *P. besseyi*, *P. insititia*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. cistena*, *P. laurocerasus*, *P. glandulosa* y *P. spinosa* (Cambra *et al.*, 2002), las cuales se han transformado en una fuente natural importante de infección (Auger & Esterio, 1995). Se ha comprobado que el virus también se puede alojar en malezas espontáneas, aunque se piensa que el rol de éstas como reservorio del virus es probablemente insignificante (Levy *et al.*, 2000b). El virus puede ser transmitido artificialmente a numerosos tipos de *Prunus*, los que son usados frecuentemente como hospederos experimentales para diferentes propósitos de investigación (Cambra *et al.*, 2002).

Sintomatología

PPV se establece y se multiplica intracelularmente en la planta, provocando distintas alteraciones en los tejidos vegetales (Auger & Esterio, 1995). Los síntomas de PPV aparecen en hojas, frutos, flores y carozos. Su intensidad varía con la especie y el cultivar de *Prunus* afectada, la raza del virus, la localización, edad de la planta, estado nutricional, estacio-

nes del año, temperatura, etc. La mayoría de las plantas afectadas recién muestran síntomas al tercer año de infección, y pueden estar restringidos a una parte del árbol e incluso a una sola rama (Auger, 1993). Algunos cultivares pueden permanecer asintomáticos (Levy *et al.*, 2000b).

A continuación se detallan los principales síntomas en las distintas especies.

Ciruelos

En hojas puede presentar clorosis en las nervaduras principales, puntos, manchas y anillos cloróticos bien delimitados en el centro y difusos hacia fuera, que varían en su tamaño, forma y distribución (Foto 63). También pueden aparecer hojas deformadas. Estos síntomas, se mantienen en toda la temporada, aunque son más notables en primavera. Los frutos externamente pueden mostrar manchas, líneas y/o anillos cloróticos que con el tiempo se vuelven necróticos, se agrietan, presentan amarronamiento de la pulpa y se reduce drásticamente su calidad comercial (Foto 64) (Nemeth, 1986; Levy *et al.*, 2000b). Al igual que la mayoría de las enfermedades virales, el sharka no mata al árbol, pero puede reducir drásticamente la productividad debido a la pérdida de valor comercial, o la caída prematura de la fruta. Estos daños pueden llegar al 100% en montes con altas infecciones virales y afectados por PPV-M (Nemeth, 1986).

En Hungría se han observado canchros verdosos en brotes de ciruelos infectados en otoño (Levy *et al.*, 2000b).

En Argentina no se han observado síntomas en frutos de ciruelo europeo cv. D'agen afectados por PPV-D, mientras que si se han observado severos síntomas en frutos de ciruelo japonés cv. Red Beaut (Porcel, *com. personal*).

Damascos

A inicio de la primavera aparecen en las hojas líneas, bandas o anillos cloróticos difusos de forma y tamaño variables, que se ubican generalmente en las nervaduras secundarias o también en algunos casos en los bordes de las hojas; estos síntomas tienden a desaparecer a medida que aumenta la temperatura en verano

y se distribuyen sólo en algunos brazos o ramillas del árbol. Los frutos pueden presentar en su superficie protuberancias o depresiones circulares (Foto 65). La pulpa puede mostrar un aspecto corchoso y gomoso, haciendo el fruto no comestible. Es posible observar también caída prematura y abundante de frutos. La presencia de los síntomas en frutos aparece poco antes de la maduración. Además en esta especie es característica la formación de anillos o manchas circulares claras en los carozos (Foto 66) (Nemeth, 1986; Levy *et al.*, 2000b).

Durazneros y nectarinos

Los síntomas en el follaje son poco evidentes y consisten en líneas o pequeñas áreas cloróticas a lo largo de las nervaduras secundarias y terciarias, acompañados en algunos casos con deformación de la lámina (Foto 67). En general estos síntomas son más notables en plantas jóvenes o severamente rebajadas con la poda. En estas especies, la visualización de los síntomas en frutos se debe realizar durante el período de cosecha. Consisten en manchas o anillos en la piel, pero no se producen deformaciones. Las variedades de pulpa blanca presentan anillos de color blanco-verdoso y en las variedades de pulpa amarilla, éstos son de un amarillo intenso (Foto 68). El carozo no presenta síntomas. En algunos cultivares se pueden observar manchas pigmentadas en pétalos de flores (Foto 69). En general, los cultivares de maduración temprana muestran más síntomas en frutos que los de maduración tardía (Nemeth, 1986; Levy *et al.*, 2000b; Cambra *et al.*, 2002).

Distribución en el país

Hasta el presente, sólo dos focos de la enfermedad del sharka han sido detectados en Argentina. El original fue encontrado en el departamento de Pocito y en el Valle de Tulúm, ambos en la provincia de San Juan, donde se han obtenido los valores de incidencia de la enfermedad más altos, entre 0,3 y 1,82%. La enfermedad fue detectada en ciruelo japonés (*Prunus salicina* cv. 'Red Beaut') y damasco (*P. armeniaca* cv. 'Bulida'). El segundo foco de infección apareció en la pro-

vincia de Mendoza, Oasis Sur, con bajos porcentajes de incidencia, entre 0,3 y 0,025%, detectándose en ciruelo europeo (*P. domestica* cv. 'D'Agen'). Tras la confirmación del diagnóstico por parte de INTA, se dio aviso al SENASA y se procedió a la erradicación inmediata de las plantaciones afectadas. En cuanto a los daños que produce la enfermedad en el país, cabe aclarar que en el monte comercial de San Juan donde se hizo la primera detección, la fruta estaba afectada prácticamente en un 100%, incluso se producía su caída antes de la maduración. En los demás montes comerciales tanto de San Juan como de Mendoza, no se observaron daños de tal magnitud.

En las zonas productivas de las provincias de Buenos Aires, Río Negro, Neuquén, Salta, Jujuy, Catamarca y en los Oasis Este y Valle de Uco de Mendoza, hasta el momento no ha sido detectada la presencia de la enfermedad (Rossini *et al.*, 2009; Wagner, 2010; Rossini *et al.*, 2012).

Epidemiología

Transmisión

La transmisión del PPV ocurre principalmente de tres formas:

- 1-Por material vegetal proveniente de árboles infectados y que son utilizados como material de propagación (yemas, estacas y portainjertos). Esta forma de transmisión es la vía más frecuente de introducción del virus a zonas o países libres de la enfermedad (Auger, 1993).
- 2-Por distintas especies de áfidos (pulgones), que transmiten el virus en un proceso definido como no circulativo y no persistente. En la transmisión no circulativa el virus se asocia temporalmente con superficies del interior del tracto digestivo del pulgón, pero sin cruzar barreras celulares, ni replicarse dentro del vector (Pirone, 1991; Gray, 1996). La transmisión de tipo no persistente es aquella que se ve favorecida por tiempos de adquisición cortos y ayuno previo. El vector retiene los virus en forma infectiva por períodos breves, de minutos a horas. Los áfidos pueden adquirir el virus en un tiempo tan corto

como treinta segundos y pueden transmitirlo durante toda la hora siguiente y los que tienen abstinencia de alimentación lo pueden hacer hasta tres horas después de la adquisición (Herrera, 1994; López-Moya & López-Abella, 1995).

En la transmisión de los Potyvirus intervienen, al menos, dos proteínas virales, la proteína de la cápside viral y el factor de transmisión (helper component, HC-Pro). Este actuaría como intermediario o puente entre las partículas virales y el estilete del pulgón (Martínez-García *et al.*, 2001).

En el mundo se conocen al menos veinte especies de áfidos que han mostrado ser vectores del virus (Tabla 5.1), de las cuales quince se encuentran presentes en Argentina (Ortego, 2008). La eficiencia de transmisión depende de muchos factores, tales como la raza del virus, el cultivar y edad del hospedante, la especie de áfido y la época del año (Levy *et al.*, 2000b). Los áfidos vectores más importantes que fueron reportados en los diferentes países afectados por la enfermedad del sharka son: *Brachycaudus cardui* (L.), *B. helichrysi* (Kaltenbach), *Myzus persicae*

(Sulzer), y *Phorodon humuli* (Schrank). En relevamientos llevados a cabo con trampas amarillas ubicadas en el área cuarentenaria para sharka de la provincia de San Juan se han identificado las siguientes especies: *Brachycaudus cardui* (L.), *B. helichrysi* (Kaltenbach), *Myzus persicae* (Sulzer), *Uroleucon sonchi* (L.), *Aphis spiraeicola* Patch, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy), *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Hyperomyzus lactucae* (L.), *Hyalodaphis coriandri* (Das), *Sipha maydis* Passerini y *Pemphigus* sp. (Lanatti, Mazzitelli *com. pers.*).

No hay correlación entre la habilidad del pulgón de transmitir PPV y la habilidad para colonizar *Prunus* (Labonne *et al.*, 1995).

Normalmente, el virus llega a un área o región por el material de propagación y posteriormente se van infectando los árboles alrededor de los infectados previamente a través de los pulgones, generando un típico patrón de dispersión a través de vectores aéreos (Herrera, 2009).

Generalmente, la propagación natural del virus es baja en invierno, pero elevada en primavera y otoño (Levy *et al.*, 2000b).

Tabla 5.1. Especies de pulgones vectores de *Plum pox virus*

Especie de Pulgón	Coloniza Prunus	Hospedante
<i>Aphis arbuti</i>	No	<i>Arbutus unedo</i>
<i>A. craccivora</i> *	No	Polífago
<i>A. fabae</i>	No	Polífago
<i>A. gossypii</i> *	No	Polífago
<i>A. hederæ</i>	No	<i>Hedera helix</i>
<i>A. spiraeicola</i> *	Ocasionalmente	Polífago; Manzano; Citricos
<i>Brachycaudus cardui</i>	Si	<i>Prunus</i> ; Compositae
<i>B. helichrysi</i> **	Si	<i>Prunus</i> ; Compositae
<i>B. persicae</i> *	Si	<i>Prunus</i>
<i>Dysaphis plantaginea</i>	No	Manzano; <i>Plantago</i>
<i>D. pyri</i>	No	Peral; <i>Callium</i>
<i>Hyalopterus pruni</i> *	Si	<i>Prunus</i> ; <i>Fragmites</i>
<i>Macrosiphum rosae</i>	No	Rosa; Dipsaceae
<i>Megoura rosae</i>	No	Leguminosaeae
<i>Myzus persicae</i> **	Si	Polífago
<i>M. varians</i>	Si	Duraznero; <i>Clematis</i>
<i>Phorodon humuli</i> **	Si	<i>Prunus</i> ; Lúpulo
<i>Rhopalosiphum padi</i>	No	<i>Prunus padus</i> ; Gramineae
<i>Sitobion fragariae</i>	No	Rosa; Gramineae
<i>Uroleucon sonchi</i>	No	<i>Lactuca</i> ; <i>Sonchus</i>

*Reconocidos vectores, ** Vectores más importantes. Datos comunicados por J.B. Quiot, INRA, Montpellier, France.

3-Los frutos infectados constituyen un tipo especial de fuente, ya que ellos son trasladados entre diferentes localidades después de su cosecha, lo que puede contribuir a la expansión de la enfermedad de un monte a otro (Levy *et al.*, 1995; Labonne and Dallet, 2006). Frutos inmaduros de ciruelo D'agen infectadas con PPV (cosechados en enero) y sobre-maduros (cosechados en marzo) presentaron altas concentraciones virales en las semillas; mientras que en frutos maduros (cosechados en febrero) tanto la semilla como la piel tuvieron elevadas concentraciones diferenciándose significativamente de la pulpa para las condiciones de San Rafael, Mendoza, Argentina. Estos resultados dan una primera aproximación acerca de qué parte del fruto conviene muestrear para poder detectar el PPV por la técnica serológica DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) con resultados confiables, de acuerdo al grado de madurez del fruto. Asimismo los resultados obtenidos darían la pauta que este órgano podría ser una fuente extra de inóculo de la enfermedad (Marini *et al.*, 2010).

Numerosas evidencias sugieren que el PPV no se transmite por implementos de labranza (tijeras de podar, maquinarias, etc.) (Levy *et al.*, 2000b). Algunos Potyvirus, género al que pertenece el virus del sharka, se transmiten por semillas en leguminosas. La transmisión por semilla del virus del sharka ha sido investigada en muchos países con resultados contradictorios. En 1961 se reportó por primera vez transmisión por semillas en damasco (Szirmai *et al.*, 1961). Después de eso se citaron transmisiones por semilla en ciruelo, y duraznero (Savulescu & Macovei, 1965; Coman & Cociu, 1976; Nemeth & Kolber, 1982). Sin embargo, experimentos llevados a cabo en los años 90 usando técnicas serológicas y moleculares no confirmaron los primeros resultados (Eynard *et al.*, 1991; Dulic-Markovic and Rankovic, 1997; Myrta *et al.*, 1998; Pasquini *et al.*, 1998, 2006; Glasa *et al.*, 1999). En un ensayo realizado durante dos años consecu-

tivos con frutos maduros provenientes de plantas de ciruelo europeo cv. D'agen 707 infectadas con PPV raza D de San Rafael, Mendoza, no se detectó la presencia del virus en la semilla de los carozos de frutos enfermos, después de los 75 días de estratificación a 4°C (durante el primer año del ensayo) y después de los 110 días de estratificación (en el segundo año del ensayo) (Marini *et al.*, 2012a). Todas las plántulas provenientes de los carozos estratificados dieron negativo por ELISA y por IC-RT-PCR (immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction) para PPV después de 2 años de plantadas (Marini *et al.*, 2012b).

Período de Incubación

El período de incubación del virus es influenciado por la especie hospedera, el cultivar, la especie del vector, el momento de infección y la raza de PPV (Nemeth, 1986). En general, el período de incubación puede tomar de nueve a trece meses, mientras que la propagación sistémica a toda la planta en árboles pequeños transcurre en un lapso de dos a tres años (Herrera, 1994).

Distribución espacial y temporal de la enfermedad

La diseminación secundaria de la enfermedad está influenciada por muchos factores, tales como el mecanismo de la infección primaria u original, la diversidad de especies vectoras, la edad y estructura del monte infectado, la presencia de inóculo en montes aledaños, la dirección del viento, la raza de PPV, la especie y el cultivar del hospedero, etc (Dallet *et al.*, 2003).

Fueron identificados dos tipos de movimientos de los áfidos vectores, a corta y a larga distancia. En estudios de distribución espacial del PPV-D, llevados a cabo en distintos países, se han encontrado diferentes comportamientos de los áfidos virulíferos. Análisis realizados en montes de durazneros de Pennsylvania, Estados Unidos, sugieren que los pulgones no se mueven hacia los árboles adyacentes, sino hacia árboles más alejados del foco de infección (Gottwald, 2006). Estos

resultados coinciden con los hallados en el Sur de España, en montes de damascos y durazneros (Gottwald *et al.*, 1995). Sin embargo, no son coincidentes con los obtenidos en Francia con PPV-M, donde mostraron que los árboles con síntomas nuevos a menudo estaban al lado de árboles previamente enfermos, constituyendo un grupo de infección con el tiempo. El patrón de infección mostraba una forma elipsoidal (a lo largo de la hilera de plantación) con una extensión de hasta 14 árboles en la hilera y hasta 10 árboles entre hileras. Tales patrones sugirieron que la diseminación por áfidos a árboles vecinos ocurría frecuentemente. Nuevos estudios de transmisión por áfidos a corta distancia demostraron que el 80% o más de nuevos árboles enfermos se encontraron dentro de los 12 metros de un árbol previamente detectado. Se ha comprobado también que en la mayoría de los casos incrementando la distancia por sobre los 10 metros de un árbol previamente infectado decrece el riesgo de infección en un 43% (Dallot *et al.*, 2003; Labonne & Dallot, 2006). En forma similar grupos de infección de PPV-M alrededor del foco inicial fueron encontrados en Grecia en montes de damasco (Varveri, 2006) y en España, en durazneros, donde la transmisión ocurrió hasta los 14 m en el sentido de la hilera, con una distancia promedio de 6 m (Capote *et al.*, 2010).

La transmisión de PPV por vectores también ocurre a larga distancia, entre montes frutales. Estudios realizados en Francia sobre cientos de hectáreas, para PPV-M, demostraron que el 90% de los árboles infectados ocurren en un radio de 200 m del foco inicial de infección, aunque también se registraron infecciones a distancias mayores a 600 m (Labonne & Dallot, 2006). Mientras que estudios en España encontraron transmisiones dentro de un radio de 150 m, con una distancia promedio de 65 m (Capote *et al.*, 2010).

Numerosos ensayos llevados a cabo en los años noventa en Francia demostraron que la enfermedad de sharka se transmite más rápidamente en durazneros infectados con PPV-M, que en damascos infectados con PPV-D. Se encontró además que sin medidas de control de la enfermedad, se podría alcanzar un 100%

de incidencia en 5 a 6 años en montes de durazneros afectados por PPV-M. Mientras que llegar al mismo nivel de infección, en montes de damascos afectados por PPV-D, podría tomar 16 años (Labonne & Dallot, 2006).

Se han realizado estudios epidemiológicos del PPV en montes de ciruelos alrededor del área de cuarentena para sharka en la provincia de San Juan, Argentina. Se seleccionaron fincas productoras de ciruelo japonés cv. Red Beaut, susceptible a PPV, a fin de detectar y evaluar la distribución espacial y temporal del virus alrededor del área considerada cuarentenaria. Se establecieron 4 zonas por encima de los 10 km del área cuarentenaria (Pocito), Zona Norte (Dpto Albardón), Zona Nor-Oeste (Dpto Ullúm), Zona Nor-Este (Dpto. San Martín) y Zona Oeste (Dpto. Zonda), y se muestrearon 9 lotes en total, siguiendo un esquema de muestreo jerárquico (Hughes *et al.*, 2002; Gottwald, 2006) en 100 plantas/lote, tomadas en grupo de a 4 plantas dispuestas en cuadrículas de 2x2, lo cual constituyó 25 grupos de plantas por lote delimitado por 400 plantas cada uno de ellos (Fig. 5.1). Las muestras se analizaron serológicamente por DAS-ELISA, durante la primavera de los años 2009, 2010 y 2011. Los análisis determinaron lotes positivos a PPV y se estimó la incidencia del virus en dos niveles jerárquicos: 1° nivel entre grupos de árboles dentro de lote, y 2° nivel jerárquico entre todos los grupos de todos los lotes (entre lotes). De los 9 lotes, 5 fueron positivos a PPV con distintos niveles de incidencia (Fig. 5.2). La incidencia entre todos los lotes en 2009 fue de 0,04, en 2010 del 0,13, y en 2011 de 0,08. Los lotes positivos se encontraron en el Dpto. Albardón con incidencias del 0,03 al 0,45 y uno del Dpto. Ullúm con el 0,01. Con esta información se puede estudiar el comportamiento de la incidencia de la enfermedad de manera temporo-espacial, conjugando factores ambientales del patosistema frutal-virus-vector. En función de las referencias recopiladas, el tiempo mínimo de estudio o de datos recabados para modelizar una epidemia es de al menos cinco años (Dal Zotto *et al.*, 2012).

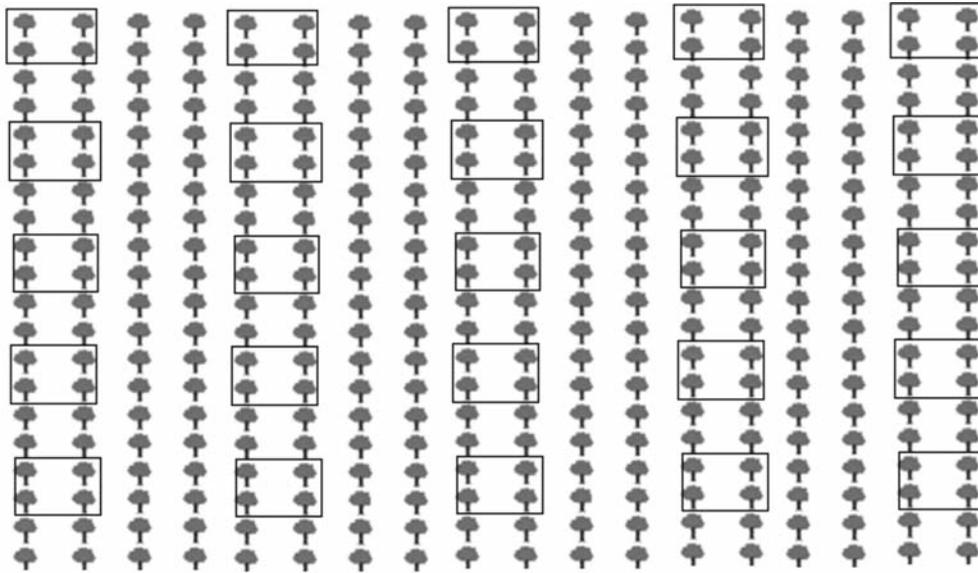


Figura 5.1. Diseño de muestreo dentro de lote de 25 unidades experimentales (u.e) para estudios epidemiológicos del *Plum pox virus* en montes de ciruelos alrededor del área de cuarentena para sharka en la provincia de San Juan.

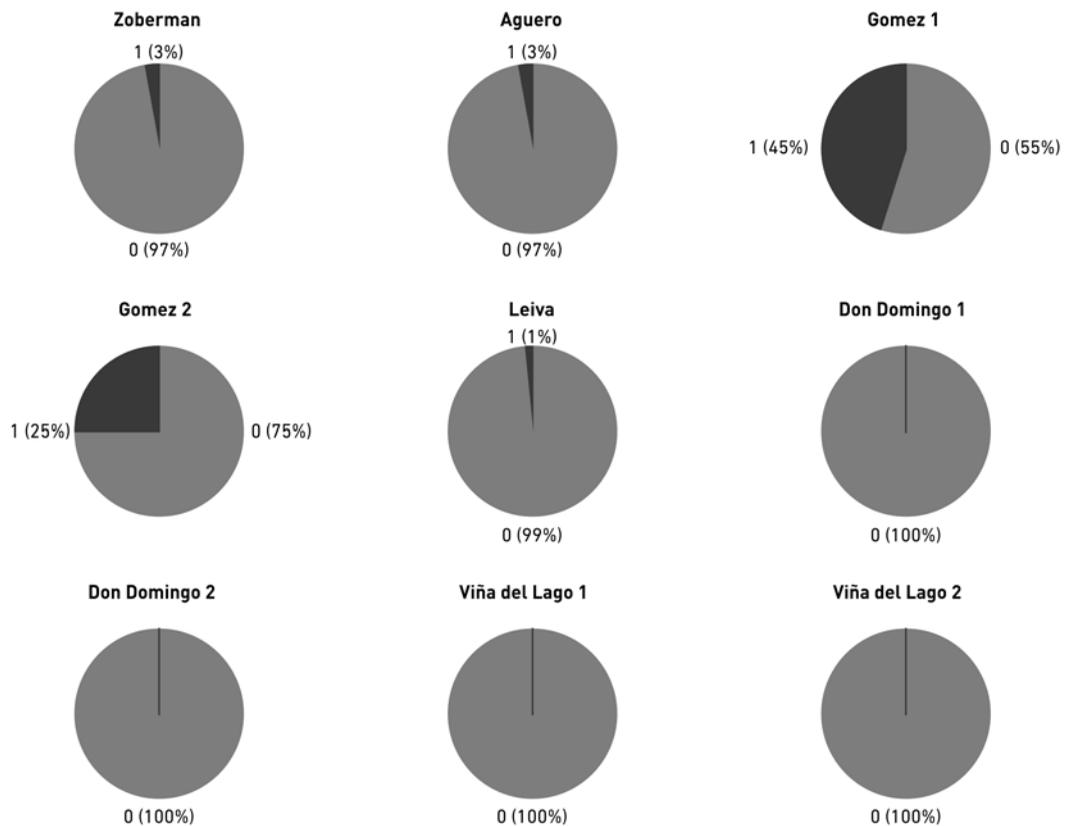


Figura 5.2. Gráfico de sectores por lote, se indica el porcentaje de incidencia. I: PPV (+) y o: PPV (-). Estudios epidemiológicos del *Plum pox virus* en montes de ciruelos de alrededor del área de cuarentena para sharka en la provincia de San Juan.

Técnicas de detección

Inspección visual

La inspección visual de síntomas de hojas y frutos durante la primavera y el verano puede llegar a indicar la presencia de la enfermedad del sharka, pero se ha llegado a la conclusión de que el análisis en el laboratorio es fundamental, ya que se ha visto presencia de síntomas no específicos, pérdida de síntomas terminada la temporada de crecimiento y la existencia de cultivares asintomáticos (Auger, 1993). El virus puede detectarse por tests de laboratorio al poco tiempo de la inoculación y recién mostrar síntomas a los 3 años de inoculado (Levy *et al.*, 2000b).

Test biológicos

Se basa en la propiedad de que esta enfermedad es transmisible mediante injertos. El PPV puede ser detectado por síntomas en numerosas especies de plantas indicadoras leñosas, tales como cerezo Nanking (*Prunus tomentosa*), duraznos: cv. GF-305 (*P. persica*), cv. Elberta (*P. persica*), cv. Nemaguard (*P. persica*); ciruelos: Italian prune (*P. domestica*), y Adesoto 101 (*P. insititia* L.). También se usan las indicadoras herbáceas *Chenopodium foetidum*, *C. quinoa*, *Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana* y *Pisum sativum*, de las cuales las últimas tres se utilizan para concentrar el inóculo (Cambra *et al.*, 2002). De las indicadoras leñosas las más utilizadas son GF 305, Nemaguard y cerezo Nanking.

Las plantas indicadoras son injertadas/inoculadas y después de 15 días, rebajadas a unos 3 cm por sobre el injerto. Al cabo de tres a cuatro semanas se observan los síntomas sobre los brotes nuevos (Foto 70). Se utilizan al menos cuatro repeticiones y se comparan los síntomas con plantas de control negativo y positivo. Todo el proceso se realiza en invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (Desvignes, 1999). No existen datos cuantitativos publicados referentes a la especificidad, sensibilidad y exactitud de los resultados obtenidos en test biológicos. Sin embargo, el método es usado ampliamente en los esquemas de certificación y es considerado un método sensible de detección. Aunque tiene algunas desventa-

jas: la lentitud para obtener resultados, se necesitan invernaderos con condiciones controladas, amplio espacio, y algunas veces los síntomas pueden confundirse con los producidos por otros patógenos sistémicos. Además, hay algunas razas asintomáticas del virus que no producen síntomas en las plantas indicadoras (Cambra *et al.*, 2012).

Test serológicos

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) ha demostrado ser un método altamente sensible, rápido y confiable para la detección del PPV y es la técnica recomendada para el análisis de un gran número de muestras (Cambra *et al.*, 2012). Hay disponibles varios anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección de todos los serotipos de PPV, por lo que es posible discriminar que raza específicamente se encuentra en la planta (Levy *et al.*, 2000b; Cambra *et al.*, 2012). Mediante la técnica ELISA, PPV puede ser detectado usando como muestras brotes, flores, hojas, yemas, corteza y frutos de las plantas infectadas (Dosba *et al.*, 1986). ELISA permite detectar la presencia del antígeno viral (proteína de la cubierta del virus) a partir de homogenizados del material infectado a través de una reacción colorimétrica, que se genera por acción de la actividad de una enzima conjugada a anticuerpos en presencia del sustrato adecuado (Cambra *et al.*, 2002).

La toma de muestras es una de las claves para las pruebas de diagnóstico, ya que el virus tiene una distribución muy heterogénea en la planta y su concentración es baja, especialmente en los meses de verano y otoño. Es necesario tomar muestras significativas y representativas de la planta a analizar (Dosba *et al.*, 1986). En ensayos realizados dos años consecutivos en la zona de San Rafael, Mendoza, Argentina, en ciruelo europeo cv. D'Agén, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de absorbancia por test DAS-ELISA en los distintos meses del año, en los órganos muestreados, entre las distintas ramas (norte, sur, este y oeste) y sectores de la planta (general, alto, medio y bajo) (Marini *et al.*, 2011; García, 2010).

Cuando se analizaron estadísticamente las absorbancias virales medias corregidas (absorbancia de las muestras menos la absorbancia del testigo sano) obtenidas por DAS-ELISA de los datos del primer año del ensayo, en el estudio de comparación de medias de los meses del año, los mayores valores se obtuvieron en los meses de octubre, noviembre y diciembre, mientras que marzo, abril, mayo, junio y julio tuvieron los niveles más bajos durante el primer año de estudio (Marini *et al.*, 2012b). Los datos del segundo año mostraron una disminución brusca de la absorbancia en enero/febrero y un pequeño pico en marzo. Asimismo, la absorbancia viral obtenida en yemas de junio, julio y agosto, fue muy superior a la del primer año. Estas variaciones podrían deberse a diferencias en condiciones climáticas, principalmente temperatura, entre los años. Comparando los dos años, el período ideal de muestreo en los cuales se obtendrían resultados confiables por DAS-ELISA para el sur de Mendoza estaría comprendido entre los meses de octubre, noviembre y diciembre (Fig. 5.3).

Estos resultados se asemejan a lo establecido por la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) donde se recomienda el muestreo en primavera,

desaconsejando realizar los test serológicos cuando las temperaturas aumentan, desde Enero a Marzo, para climas mediterráneos (EPPO Bulletin, 2004). También guarda cierta similitud a lo recomendado por el Departamento de Agricultura de Pennsylvania y el USDA (United States Department of Agriculture) en EEUU, donde aconsejan muestrear en primavera y principios de verano (Levy *et al.*, 2000b). Comparando las absorbancias medias obtenidas mediante DAS-ELISA para los diferentes órganos muestreados a lo largo del ensayo se observa que las hojas jóvenes y las flores presentan las mayores concentraciones virales, diferenciándose significativamente de los frutos, yemas y hojas maduras (Fig. 5.4) (Marini *et al.*, 2012b). Las hojas jóvenes se encuentran en los meses de noviembre y diciembre, mientras que las flores están presentes en octubre, para las condiciones del sur de Mendoza. Como se puede ver hay una relación de este resultado con el obtenido para los meses más propicios para realizar DAS-ELISA, ya que los dos órganos están presentes en los meses donde se obtiene la mayor concentración viral. Estos resultados concuerdan con lo citado por la EPPO, donde aconsejan muestrear flores, brotes jóvenes o pequeños frutos (EPPO Bulletin, 2004).

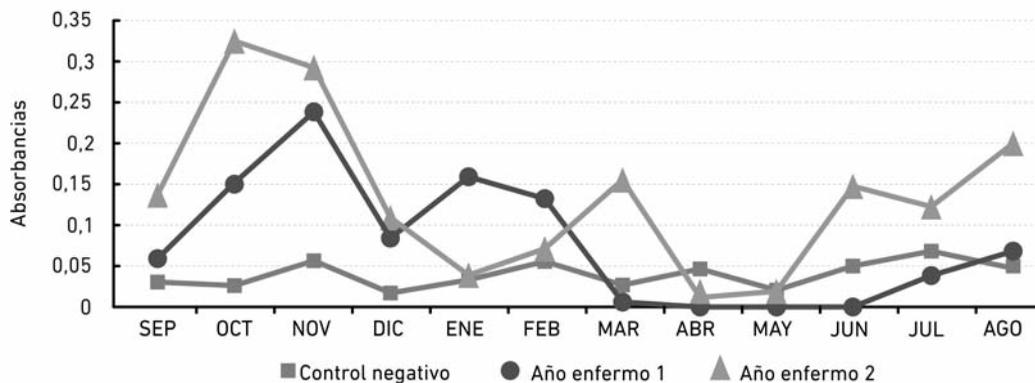


Figura 5.3. Variación de la concentración del virus de sharka a lo largo del primer y segundo año en ciruelos europeos.

Sin embargo, en investigaciones realizadas en damascos y durazneros no se encontraron altas concentraciones virales en flores (Dosba *et al.*, 1986; Knapp *et al.*, 1996), a diferencia de lo detectado en Mendoza para ciruelo europeo, lo que indicaría que se pueden encontrar diferencias de acuerdo a la especie hospedera, raza del virus y condiciones climáticas. La zona superior del árbol presentó una menor concentración viral. No se encontraron diferencias significativas entre la base y la zona media del árbol por lo cual, el muestreo oficial realizado por el SENASA (tomar muestras alrededor de la planta a la altura del pecho) sería correcto (Marini *et al.*, 2012b).

Del análisis de las hojas en todos los meses donde estuvieron presentes no se observaron diferencias significativas entre la absorbancia media de la base y el ápice. Tampoco se encontró diferencias entre base y ápice cuando se analizaron las hojas en el mes de noviembre solamente, mes donde se obtuvo la mayor concentración viral (Marini *et al.*, 2012b). Estos resultados no concuerdan con lo citado en investigaciones europeas donde recomiendan utilizar el tejido de la base de la hoja para realizar los análisis serológicos (Cambra, *com. personal*). En Argentina, en los monitoreos

oficiales (INTA-SENASA), también se utilizan muestras de la base de la hoja para realizar el test ELISA. Los resultados obtenidos en Mendoza indicarían que para las condiciones agroecológicas locales y en ciruelo europeo sería indistinto utilizar el tejido de cualquier parte de la hoja para la detección del PPV mediante esta técnica (Marini *et al.*, 2012b).

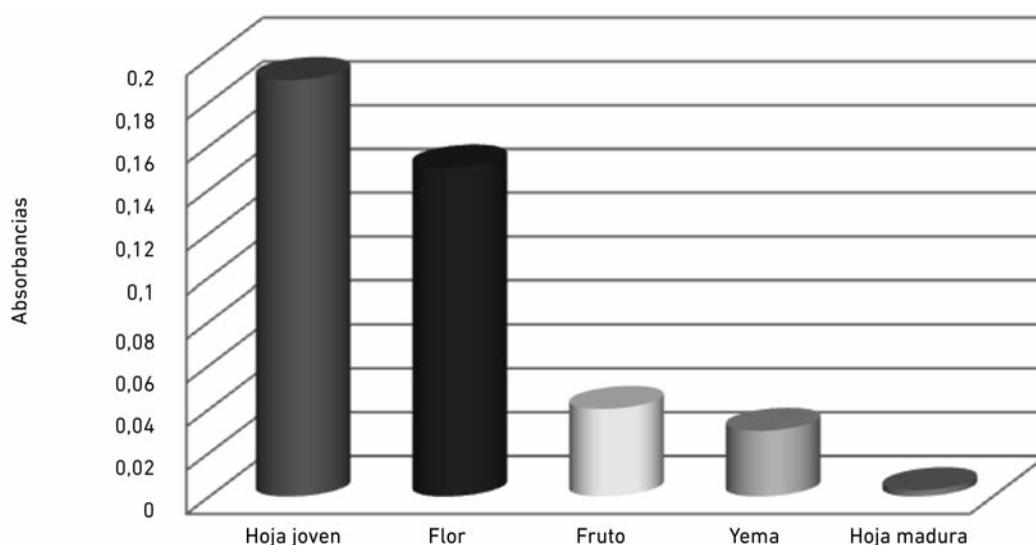


Figura 5.4. Variación de la absorbancia de los órganos muestreados durante un año.

Test moleculares

Las técnicas moleculares son más costosas y laboriosas que las técnicas serológicas, especialmente cuando se requiere realizar un gran número de muestras. Sin embargo, las técnicas moleculares, especialmente el PCR (Polymerase Chain Reaction) en tiempo real, son en general más sensitivas que las serológicas (Cambra *et al.*, 2012).

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) es una técnica muy sensible que permite detectar la presencia de virus aunque su concentración sea muy baja, ya que consiste en amplificar exponencialmente un fragmento específico del genoma viral (De Blas *et al.*, 1994). La metodología más utilizada para la detección e identificación del PPV es la Inmuncaptura RT-PCR, la cual consta de la síntesis del cDNA a partir del RNA obtenido desde partículas virales que han sido capturadas en una placa de ELISA previamente activada con un anticuerpo policlonal anti-PPV, lo que se realiza utilizando una transcriptasa reversa. Posteriormente el cDNA es usado como templado en la amplificación del DNA por PCR, identificándose por electroforesis bandas de DNA de tamaños específicos. Es una técnica muy sensible, ya que la inmuncaptura permite concentrar las muestras y al mismo tiempo disminuye los posibles interferentes presentes en el tejido vegetal, los que afectan negativamente los procesos enzimáticos en la transcripción reversa y la amplificación por PCR. Como desventaja de esta técnica se puede mencionar que es necesario conocer secuencias específicas del genoma de interés y contar con un anticuerpo que reconozca (capture) al patógeno (Rosales *et al.*, 1996).

En cuanto a los cebadores o "primers" utilizados, el que amplifica el gen de la proteína de la cubierta del virus (Wetzel *et al.*, 1991) es el más usado para la detección e identificación del PPV. Se caracteriza por su polivalencia, es decir, permite la identificación de múltiples aislados del virus, descrito en diferentes lugares del mundo (Wetzel *et al.*, 1992). Por otra parte, el primer descrito por Hadidi (Hadidi y Levy, 1994) amplifica la región 3' no codificante del genoma del PPV, región que se caracteriza por ser heterogénea en

cuanto tamaño, secuencia y estructura secundaria entre los distintos miembros del grupo de los potyvirus; sin embargo, esta secuencia no traducida es más conservada que el gen de la proteína de la cubierta y diferencia correctamente al PPV de otros potyvirus, lo que la convierte en un excelente marcador genético para ser usado con fines de diagnóstico (Riechmann *et al.*, 1992).

El Co-operational RT-PCR (CO-RT-PCR) es un método nuevo y altamente sensitivo para detectar PPV que consiste en la acción simultánea de 4 primers. El proceso consiste en la retro transcripción de dos fragmentos diferentes del mismo blanco, uno conteniendo al otro, la producción de cuatro amplicones y la co-operacional acción de los amplicones para la producción del fragmento más largo. Este método fue 100 veces más sensible que la RT-PCR usando los primers de Wetzel (Olmos, Bertolini & Cambra, 2002).

En los últimos años se ha empezado a utilizar para la detección del virus, PCR en tiempo real, que es una técnica altamente sensible y una herramienta valiosa para la detección y cuantificación del PPV (Capote *et al.*, 2009). En la PCR en tiempo real la detección del amplicón se puede visualizar directamente a medida que la amplificación progresa, sin necesidad de hacer corridas electroforéticas. Las técnicas de PCR cuantitativa se clasifican según el empleo de fluorocromos no específicos o bien de sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente a aquél. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green. En la de sondas moleculares, se usa un par de primers y una sonda marcada fluorescentemente, diseñada para que se hibride entre el sitio de unión de los dos primers. Típicamente esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); esto es, en el amplicón. De este modo, cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce

cuando los dos fluorocromos están distantes debido a la degradación de la sonda, o bien debido a la separación física de los fluorocromos por un cambio en la conformación de la sonda. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de la fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (Mackay *et al.*, 2002). En el PCR en tiempo real, el proceso previo de extracción del RNA puede ser evitado por inmovilización del extracto de las plantas en papel Whatman 3 MM, o en membrana de nylon, y procediendo después a realizar el PCR en tiempo real (Olmos *et al.*, 2005).

Finalmente, Next-Generation Sequencing (NGS), en combinación con la bioinformática, parece ser el futuro en las técnicas de detección de virus conocidos o no en plantas (Hadidi, 2012).

Manejo de la enfermedad

A diferencia de los hongos y las bacterias que colonizan plantas, que pueden ser controlados químicamente, no existen tratamientos antivirales para prevenir o controlar al PPV. Los métodos de manejo más efectivos son los siguientes:

- Detección temprana de la enfermedad, mediante monitoreo de plantas madre en viveros y campos comerciales por uso de técnicas sensibles en el momento oportuno, y subsecuente destrucción y erradicación de las plantas enfermas. Se recomienda erradicar los árboles positivos, ya que no hacerlo implica mantener una fuente de inóculo en el cultivo, que va a producir fruta de mala calidad y una dispersión de la enfermedad. La eliminación de las plantas enfermas debe hacerse antes de las infestaciones otoñales, así se evita la dispersión a los ejemplares sanos. La planta debería ser quemada en su totalidad y para eliminar el resto de material vegetal que quede en el suelo se debería aplicar herbicida (Auger & Esterio, 1995; Levy *et al.*, 2000b).
- Utilización de plantas frutales certificadas, “libres de los virus conocidos” para la implantación de nuevos montes frutales (Auger y Esterio, 1995; Levy, 2000b; Ma-

rini *et al.*, 2012c). Mendoza ha sido precursora en el país en la creación de un proyecto de certificación en frutales de carozo. En un esfuerzo de 18 años de trabajo conjunto de organismos públicos: INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), ISCAMEN (Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria Mendoza) e INASE (Instituto Nacional de Semillas), y con financiamiento de INTA, SECYT (Sec. de Ciencia y Técnica de la Nación) e ISCAMEN, se logró constituir un plantel formado por los principales cultivares y portainjertos de duraznero, ciruelo y almendro libre de los principales virus que afectan a la fruticultura nacional. Dicho monte se encuentra ubicado en un lugar aislado de otros frutales en el campo anexo de la EEA Junín, INTA, en Rivadavia, Mendoza (Marini *et al.*, 2012c).

- En caso de introducción de material de países y/o zonas afectadas por la enfermedad, es importante exigir que sea libre de sharka.
- Uso de cultivares y portainjertos resistentes ó inmunes producidos por ingeniería genética o generados por programas de mejora de genética convencional. La utilización de cultivares y portainjertos resistentes a la enfermedad del sharka, parece ser el único método definitivo de control (Dicenta *et al.*, 2000). Sin embargo, existe muy poco germoplasma que puede llamarse resistente o inmune al PPV en *Prunus*. Hay fuentes de resistencia, generalmente multigénica, que provee moderados niveles de tolerancia a algunas razas del virus. Si bien estos niveles de tolerancia son útiles para los productores debido a que les permite producir fruta comercializable, se necesita resistencia o inmunidad al virus para evitar la dispersión posterior por vectores (Levy *et al.*, 2000b).

El método usado tradicionalmente para evaluar resistencia ha sido la observación de síntomas en hojas y frutos de plantas inoculadas natural o artificialmente con el virus, a campo o en invernaderos aislados, en aquellos países donde

la enfermedad no se ha diseminado (Dícenta *et al.*, 2000; Martínez-Gómez *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos han sido muy contradictorios debidos a factores dependientes de la raza del virus usada como inóculo, el método de inoculación, el tiempo desde la inoculación a la observación de los síntomas, etc. (Levy *et al.*, 2000b). El estudio de la habilidad de un genotipo de permitir el movimiento del virus a través de sus tejidos vasculares (xilema y floema) fue propuesto como un método alternativo para evaluar resistencia (Rubio *et al.*, 2008). En un ensayo realizado en Mendoza para evaluar la resistencia al aislado argentino del PPV de cultivares de durazno para industria, los genotipos “Pavía Catherina” y “Loadel” permitieron el movimiento del virus a través del xilema y floema de sus respectivas plantas, sin mostrar síntomas visibles en hojas y flores, durante dos ciclos de evaluaciones. Estos resultados son preliminares, dado que se necesitan por lo menos 6 ciclos de evaluaciones para determinar la posible tolerancia de los genotipos estudiados al virus (Marini *et al.*, 2012d).

Los métodos tradicionales para generar resistencia a la enfermedad del sharka, a través de cruzamientos, han tenido un éxito muy limitado debido a la naturaleza multigénica de la resistencia, y a que esa resistencia es específica para cada raza del virus. El tiempo requerido para incorporar un alto nivel de resistencia multigénica a todos las razas del virus, más las características comerciales deseables del cultivar y/o portainjertos puede llevar más de 20 años. Un método alternativo, es la transformación de las plantas con genes virales, tales como el de la proteína de cubierta del virus (CP). Plantas transgénicas que expresan genes virales han demostrado diferentes niveles de resistencia. La CP del PPV ha sido transferida a ciruelo japonés, y una línea transgénica, “Honey Sweet” (C5), ha demostrado un alto nivel de resistencia en más de 10 años de ensayos en diferentes países (Zagrai *et al.*, 2008). La resistencia parece ser debida al silenciamiento genético post-transcripcional.

El gen es heredado como un simple gen dominante y la progenie ha demostrado ser resistente a PPV (Scorza *et al.*, 2004). Debido a que la transformación de otras especies de *Prunus* no ha resultado satisfactoria hasta el presente, Honey Sweet podría ser utilizado como padre en programas de mejoramiento, con la ventaja de que su resistencia se hereda como un gen simple y dominante, que permite seleccionarlo en la progenie mediante técnicas de PCR (Levy *et al.*, 2000).

-Medidas de manejo tales como inspecciones visuales en los campos y viveros, control químico de los pulgones, eliminación de malezas, aplicación de aceites de verano, alternar material vegetal susceptible con especies resistentes o no hospederas del virus, etc, pueden contribuir a disminuir la propagación de la enfermedad (Levy *et al.*, 2000b; Capote *et al.*, 2006).

El control de los vectores, si bien puede contribuir a disminuir la dispersión de la enfermedad, no es de gran utilidad, dado que el pulgón transmite al virus en forma no persistente. De los mecanismos de transmisión en los que participan los pulgones como organismos vectores, el de tipo no circulativo y no persistente, por sus características descritas anteriormente, es el que representa un mayor desafío en cuanto a las estrategias de prevención y control de enfermedades virales en cultivos de interés económico, haciendo inútil el uso de plaguicidas para controlar el vector y llegando incluso con su empleo a incrementar la dispersión de la enfermedad al favorecer un mayor desplazamiento de los pulgones en el cultivo (Martínez-García *et al.*, 2001). Se observaron significativas reducciones de incidencia de la enfermedad del sharka en ensayos realizados en España, Bulgaria y Rumania aplicando aceites minerales de verano (SunSpray® Ultra-fine® al 1%) (Vidal *et al.*, 2012). También se ha utilizado con éxito en la eliminación del virus la termoterapia (24-32 días a 38°C) y el microinjerto de ápices caulinares in vitro (Capote *et al.*, 2006).

Monitoreo

Sharka es una enfermedad cuarentenaria en Argentina al igual que en la mayoría de los países productores de frutas de carozo. A fin de mantener este estatus, después de la primera detección de la enfermedad en el año 2004 (Dal Zotto *et al.*, 2006), se formó una red interinstitucional para el abordaje de la problemática de la enfermedad, su diagnóstico y control, integrada por los tres organismos nacionales con injerencia en la materia: INTA, SENASA e INASE y organizaciones de protección vegetal de las provincias productoras de frutas de carozo. El primer producto del trabajo interinstitucional fue la formación de una Comisión integrada por representantes técnicos de las instituciones mencionadas que ha tomado medidas de carácter cuarentenario en forma inmediata tales como: erradicación de plantas enfermas con sharka; declaración de Áreas de Cuarentena; control de movimiento de material de propagación hospedante de la Raza "D" de PPV; análisis oficial en laboratorio del PPV en las plantas madre de las especies del género *Prunus* hospederas, previo a su multiplicación y medidas específicas en Áreas Interdictadas.

A fin de garantizar la rápida ejecución de los análisis del virus y la obtención de resultados análogos se formó una Red Oficial de Laboratorios de determinación de PPV constituida por los de las Estaciones Experimentales San Pedro, Rama Caída, Junín, Alto Valle e IPAVE (CIAP) de INTA y los laboratorios centrales de SENASA e INASE. Todos ellos trabajan con un protocolo consensuado de la técnica DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) para la detección del virus.

Análisis de plantas madre del género *Prunus*

Anualmente desde el año 2007 se analiza la presencia de PPV en las plantas madre del género *Prunus* inscriptas en SENASA y de las cuales se tomarán las yemas para formar las plantas esa temporada. Los viveristas realizan todos los años la inscripción de las plantas madre que pueden variar o no, dependiendo de las necesidades del año. La Comisión estableció un protocolo de monitoreo que incluye recolección de muestras, su acondicionamiento y envío al laboratorio de la Red Oficial previamente establecido. Cada muestra está compuesta por 16 hojas y representan dos plantas, ocho hojas de cada una. Cada año se analizan alrededor de 25.000 muestras correspondientes a unas 50.000 plantas madre de viveros del país. Las plantas PPV + son erradicadas inmediatamente. Ello implica el 100% de las plantas madre de las variedades comerciales señaladas por los viveros y un muestreo parcial de portainjertos (Rossini *et al.*, 2011).

Las plantas madre analizadas se ubican en unos setenta campos pertenecientes a treinta viveros comerciales de las provincias de Mendoza, San Juan, Río Negro, Neuquén y Buenos Aires (San Pedro). Mendoza es la provincia con mayor cantidad de muestras analizadas, más de 20.000, en coincidencia con la ubicación de la mayor cantidad de viveros (Rossini *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en siete temporadas (2007-2012) indican que el valor de incidencia de sharka más elevado corresponde al primer año de análisis del virus y a partir del tercer año, no se obtuvieron resultados positivos (Tabla 5.2). Ello es producto del análisis anual de plantas madre que permite la erradicación de las plantas enfermas, del control de movimiento del material de propagación y posiblemente debido a una baja eficacia en la transmisión natural del virus (Rossini *et al.*, 2012).

Tabla 5.2. Análisis de *Plum pox virus* (PPV) en plantas madre del género *Prunus* en el período 2007-2013.

Año	Plantas analizadas (DAS-ELISA)	Ubicación	Plantas DAS-ELISA Positivas	Ubicación (+)	Porcentaje de plantas enfermas
2007	25.277	Mendoza, Bs. As. (San Pedro)	3	Oasis Sur (Mza)	0,0125
2008	48.770	Mendoza, Bs. As. (San Pedro), Patagonia Norte	1	Oasis Sur (Mza)	0,0020
2009	47.514	Mendoza, Bs. As. (San Pedro), Patagonia Norte	0	--	--
2010	47.050	Mendoza, Bs. As. (San Pedro), Patagonia Norte	0	--	--
2011	50.236	Mendoza, Bs. As. (San Pedro), Patagonia Norte	0	--	--
2012	43.736	Mendoza, Bs. As. (San Pedro), Patagonia Norte	0	--	--

Bibliografía

- ADAMS, M. and J. ANTONIW. 2004. Notes on Family *Potiviridae*. Web site sponsored by the Association of Applied Biologists. Developed and maintained by scientists at Rothamsted Research, <http://www.dpvweb.net/notes/showfamily.php?family=Potyviridae>, consultada 22/06/12.
- ATANASOFF, D. 1932. *Plum pox*. A new virus disease. Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture, 11, 49-69.
- ATANASOFF, D. 1935. Mosaic of stone fruits. *Phytopathol. Z.* 8, 259-284.
- AUGER, J. 1993. La sharka (*Plum Pox Virus*), una amenaza latente para los frutales de carozo en Chile. *Aconex* 41: 28-30.
- AUGER, J. y M. ESTERIO 1995. La sharka (*Plum Pox Virus*), una amenaza latente para los frutales de carozo en Chile. *Aconex* 47: 25-28.
- BARBA, A.; HADIDI, A.; CANDRESSE, T. and M. CAMBRA 2010. *Plum pox virus*. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, C. Jelkmann, W. (eds). *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- BHARDWAJ, S.V.; KOHOSLA, K.; SHARMA, D.R. and P.D. THAKUR 1995. Detection of *Plum Pox virus* in India. *Acta Hort. (ISHS)* 386:237-240.
- CAMBRA, M.; CAPOTE, N.; MYRTA, A. and G. LLÁCER. 2006. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO* 36 (2): 202-204.
- CAMBRA, M.; OLMOS, A. and M.T. GORRIS. 2002. Protocol for the diagnosis of quarantine organism. *Plum pox virus*. EU DIAG PRO. www.csl.gov.uk, consultada 21/06/12.
- CAMBRA, M.; OLMOS, A.; CAPOTE, N.; AFRICANDER, N.L.; LEVY, L.; LENARDON, S.L.; CLOVER G. and D. WRIGHT. 2012. International Standards for Phytosanitary Measures. ISPM 27 Diagnosis Protocols. DP 2 *Plum pox virus*.
- CAPOTE, N.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; VIDAL, E.; MARTÍNEZ, M.C. and M. CAMBRA. 2009. Direct simple preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology* 12: 1-6.
- CAPOTE, N.; CAMBRA, M.; LLÁCER, G.; PETTER, F.; PLATTS, L.G.; ROY, A.S. and I.M. SMITH. 2006. A review of *Plum pox virus*/Unerevue du *Plum pox virus*. In: Van Opstal N. (ed.). *OEPP/EPPO Bulletin* 36 n° 2, ISSN 0250-8052, pp. 201-349. Blackwell Publishing, Paris, France.
- CAPOTE, N.; CAMBRA, M.; BOTELLA, P.; GORRIS, M.T.; MARTÍNEZ, M.C.; LÓPEZ-QUÍLEZ, A. and M. CAMBRA. 2010. Detection, characterization, epidemiology and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 92 (3), 619-628.
- CLARK, M. and A.N. ADAMS. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-immunosorbent Assay for the detección of Plant Virus. *J. Gen. Virology* 34: 475-483.
- COMAN, T. and V. COCIU. 1976. Transmission de la sharka par le pollen et par les graines. *Bulletin d'Information sharka* 2:15-21.
- DALLOT, S.; GOTTWALD, T.; LABONNE, G. and J.B. QUIOT. 2003. Spatial pattern analysis of sharka disease (*Plum pox virus* strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology* 93: 1543-1552.
- DAL ZOTTO, A.; MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA, M.; LANATI, S.; BRUNO, C. y J.M. RAIGÓN. 2010. Estudio epidemiológico preliminar sobre la dinámica del *Plum pox virus* en montes de ciruelos circundantes al área cuarentenaria para sharka en la provincia de San Juan, Argentina. *Actas del xxxiii Congreso argentino de horticultura (F SVO25)*. Rosario 28/9 al 1/10 de 2010.
- DAL ZOTTO, A.; MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA M.; MAZZITELLI, E.; BRUNO, C. y J.M. RAIGÓN. 2012. Informe trimestral INTA. PNFRU-052831 "Generación y desarrollo de tecnología para la prevención de enfermedades emergentes, cuarentenarias y limitantes en frutales".

- DAL ZOTTO, A.; ORTEGO, J.; RAIGON, J.M.; CALOGGERO, S.; ROSSINI, M. and D. DUCASSE. 2006. First Report in Argentina of *Plum Pox Virus* Causing sharka Disease in *Prunus*. *Plant Dis* 90(4): 523.
- DE BLAS, C.; ZABALGOGEAZCOA, I.; CASTRO, S. y J. ROMERO. 1994. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. *Patología Vegetal* (Tomo 1): 255-274.
- DESIGNES, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CFIFL, Centr' imprint. 202 pp.
- DICENTA, F.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; BURGOS, L. and J. EGEA. 2000. Inheritance of resistance to *plum pox potyvirus* (PPV) in apricot, *Prunus armeniaca*. *Plant Breed.* 119, 161-164.
- DOSBA, T.; LANSAC, M.; PECHEUR, G.; TEYSSIER, B.; PIQUEMAL, J.P. and M. MICHEL. 1986. *Plum Pox Virus* by ELISA technique in peach and apricot infected trees at different growing stages. *Acta Horticulturae* 193: 187-191.
- DULIC-MARKOVIC, I. and M. RANKOVIC. 1997. An experiment with *plum pox virus* transmission by apricot and peach seeds. *Proceedings of Middle European Meeting '96 on Plum Pox*, Budapest 1996: 117-119.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO) STANDARDS. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. 1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France. *EPPO Bulletin* 34 pm7-32: 247-256. well Publishing, Ltd.
- EYNARD, A.; ROGGERO, P.; LENZI, R.; CONTI M. and R.G. MILNE. 1991. Test for pollen and seed transmission on *Plum pox virus* (sharka) in two apricot cultivars. *Advances in Horticultural Science* 5: 104-106.
- FUJIWARA, Y.; SAITO, N.; KASUGAI, K.; TSUKAMOTO, T. and F. AIHARA. 2011. Occurrence and eradication strategies of *Plum Pox Virus* in Japan. *Acta Hort.* (ISHS) 899:165-170.
- GARCÍA, L. 2010. Determinación bajo las condiciones agroecológicas de la provincia de Mendoza de las mejores épocas de muestreo, sectores del árbol y órganos a muestrear para la correcta detección y monitoreo del virus del sharka (*Plum pox virus*) en ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.). Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología Molecular. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.
- GILDOW, F. 2001. *Plum Pox Virus*. College of Agricultural Sciences. Cooperative Extension. Department of Plant Pathology. Pennsylvania State University. www.cas.psu.edu/issues/sharka/review_update.htm, consultada 15/06/12.
- GLASA, M.; HRINOVSKY, I. and O. KUDELA. 1999. Evidence for nontransmission of *Plum pox virus* by seeds in infected plum and myrobalan. *Biologia* 54: 481-484.
- GLASA, M.; PRICHODKO, Y.; ZHIVAEVA, T.; SHNEIDER, Y.; PREDAJNA, L.; SUBR, Z. and T. CANDRESSE. 2012. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new strain. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICVF). Roma, Italia. June 3-8, 2012. Pp. 37.
- GOTTFWALD, T.R. 2006. Epidemiology of sharka disease in North America. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 279-286.
- GOTTFWALD, T.R.; AVINENT, L.; LLÁCER, G.; HERMOSO DE MENDOZA, A. and M. CAMBRA. 1995. Analysis of the spatial spread of sharka (*Plum pox virus*) in apricot and peach orchards in eastern Spain. *Plant Disease* 79: 266-278.
- GRAY, S. M. 1996. Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends in Microbiology* 4, 259-264.
- HADIDI, A. 2012. Next generation sequencing: applications for the detection and identification of plant viruses and viroids. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICVF). Roma, Italia. 3 al 8-06-12. Pp. 42.

- HADIDI, A. and L. LEVY. 1994. Accurate identification of *plum pox potyvirus* and its differentiation from asian prunus latent potyvirus in *Prunus* germplasm. Bulletin OEPP/EPP Bulletin 24: 633-643.
- HERRERA, G. 1994. Detección de la enfermedad de sharka (*Plum pox virus*) en una vieja colección de carozos de la subestación experimental Los Tilos (INIA), Chile. Agricultura Técnica 54 (2): 187-191.
- HERRERA, G. 2009. Virus de la enfermedad de sharka. Laboratorio de Virología. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigaciones La Platina. www.inia.cl/virologia/enfermedades/carozo_ppv.htm, consultada 15/05/12.
- HUGHES, H.; GOTTWALD, T. R. and L. LEVY. 2002. The use of hierarchical sampling in the national Surveillance program for *plum pox virus* incidence in the United States. Plant disease 86, 259-263.
- KNAPP, E.; HANZER, V.; MENDONCA, D.; DA CÁMARA MACHADO, A.; PÜHRINGER, H.; KATINGER, H. and LAIMER DA CÁMARA MACHADO, M. 1997. Distribution of PPV in developing fruits of *Prunus armeniaca*. Proc. 3rd. Middle European Meeting on PPV. Budapest 137-140.
- LABONNE, G. and S. DALLOT. 2006. Epidemiology of sharka disease in France. Bulletin OEPP 36 (2): 267-270.
- LABONNE, G. ; YVON, M. ; QUIOT, J. B. ; AVINERT, L. and G. LLACER. 1995. Aphids as potential vectors of *Plum pox virus*: Comparison of methods of testing and epidemiological consequences. Acta Hort. 386:207-217.
- LEVY, L.; DAMSTEEGT, V. and R. WELLIVER. 2000a. First Report of *Plum pox virus* (sharka Disease) in *Prunus persica* in the United States. Disease notes, Plant Disease, 84 (2): 202.
- LEVY, L.; DAMSTEEGT, V.; SCORZA R. and M. KOLBER. 2000b. *Plum Pox Potyvirus* Disease of Stone Fruits. APSNET FEATURES. Online. doi: 10.1094/apsnetfeature-2000-0300.
- LEVY, L.; HADIDI, A. and M. KOLBER. 1995. 3' Non-coding region RT-PCR detection and molecular hybridization of *Plum pox virus* in anthers of infected stone fruit. Acta Horticulturae n°386. Pp 331-339.
- LÓPEZ-MOYA, J.J. y D. LÓPEZ-ABELLA. 1995. Transmisión de virus de plantas por insectos vectores. Patología Vegetal (Tomo 1). Pp. 275-300.
- MACKAY, I.M.; ARDEN K.E. and A. NITSCHKE. 2002. Survey and summary of real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 30:1292-1305.
- MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA, M. E.; GARCIA, L. y L. PORCEL. 2010. Estudio de la detección del virus del sharka en las diferentes partes del fruto en ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) a través de la técnica serológica DAS-ELISA. XXXIII Congreso Argentino de Horticultura.. Rosario, Argentina. ISBN 978-987-97812-6-5. Pp. 182.
- MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA, M.E.; PORCEL, L. y L. GARCÍA. 2012a. Evidencias de la no transmisibilidad del virus del sharka a través de semillas en ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) en Argentina. Análisis de Semillas. N°21, Vol. 1, Tomo 6. Pgs. 88-91.
- MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA, M.E.; PORCEL, L.; FUENTES, C. y C. PICCA. 2012b. Informe trimestral INTA. PNFru-052831 "Generación y desarrollo de tecnología para la prevención de enfermedades emergentes, cuarentenarias y limitantes en frutales".
- MARINI, D.; FARRANDO, R. y M.E. OJEDA. 2012c. Sistema de certificación de plantas madres de frutales de carozo (*Prunus* sp.) en Mendoza. Análisis de Semillas. N°21, Vol. 1, Tomo 6. Pgs. 84-87.
- MARINI, D.; FARRANDO, R.; OJEDA, M.E. and A. DAL ZOTTO. 2012d. Preliminary results on studies of resistance to *Plum Pox Virus-D* in *Prunus* in Argentina. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICV.F). Roma, Italia. 3 al 8-06-12. Pp.195.

- MARTÍNEZ-GARCÍA, B.; LLAVE, C.; ATENCIO, F.A.; DÍAZ-RUIZ, J.R. y D. LÓPEZ-ABELLA. 2001. La transmisión de los potyvirus por pulgones (revisión). *Invest. Agr: Prod. Prot. Veg.* Vol. 16 (2), 149-167.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. and F. DICENTA. 2001. Distribution of coat protein and nucleic acid of *Plum pox virus* (PPV) in seedlings of peach rootstock GF305 and apricot cv. Real Fino. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 157-164.
- MATTHEWS, R. and R. HULL. 2002. Replication II: Viruses with Single-Stranded Positive Sense RNA Genomes. In: *Plant Virology*. 4th ed. Academic Press, Inc. San Diego, CA, US.
- MAZYAD, H. M.; NAKHLA, M.K.; ABO ELELA, A. and M. H. EL HAMMADY. 1992. Occurrence of *plum pox* (sharka) virus on stone fruit trees in Egypt. *Acta Hort.* 309: 119-124.
- MYRTA, A.; DI TERLIZZI, B. and V. SAVINO. 1998. Study on the transmission of *Plum pox potyvirus* through seeds. *Phytopathologia Mediterranea* 37: 41-44.
- NAVRAHL, M.; SAFAROVA, D.; KARESOVA, R. and K. PETRZIK. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in China. *EPP0 Bulletin*, 36:207.
- NEMETH, M. 1986. Virus diseases of stone fruit trees. In: Nemeth, M. *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Martinus Nijhoff Publishers, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary. Pp. 84
- NEMETH, M. and M. KOLBER. 1982. Additional evidence on seed transmission of *Plum pox virus* in apricot, peach and plum, proved by ELISA. *Acta Horticulturae* 130: 293-300.
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E. and M. CAMBRA. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51-59.
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; GIL M. and M. CAMBRA. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155.
- ORTEGO, J. 2008. Informe fitosanitario sobre sharka. EEA Junín INTA. Proyecto Nacional 1862 "Diagnóstico precoz para la prevención de las enfermedades Tizón de Fuego y sharka en frutales de pepita y carozo en Argentina".
- PALMISANO, F.; BOSCIA, D.; MINAFRA, A.; MYRTA, A. and T. CANDRESSE. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICV.F). Roma, Italia. June 3-8, 2012. Pp. 33.
- PASQUINI, G. and M. BARBA. 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin* 36: 287-292.
- PASQUINI, G.; SIMEONE, A.M.; CONTE, L. and M. BARBA. 1998. Detection of *Plum pox virus* in apricot seeds. *Acta Virologica* 42: 260-263.
- PIRONE, T.P. 1991. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology* 2, 81-87.
- RIECHMANN, J.L.; LAÍN, S. and J.A. GARCÍA. 1992. High-lights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- ROSALES, M.; HINRICHSEN, P. y G. HERRERA. 1996. Detección específica mediante PCR de un aislado del *virus plum pox* (PPV) en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 56 (2): 89-98.
- ROSSINI, M.; WAGNER, F.; ASCIUTTO, K.; MARINI, D.; PORCEL, L.; DAL ZOTTO, A.; MANNA, M.E.; BELGORODSKY, L.; GIAYETTO, A.; ARROYO, L.; FARRANDO, R. y M.E. OJEDA. 2011. Análisis de la presencia de sharka en plantas madre del género *Prunus* en Argentina. IV Encuentro Tres Fronteras y II Encuentro Internacional Sin Fronteras en el cultivo de duraznero. Mendoza, Argentina. 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2011: 8.

- ROSSINI, M.; WAGNER, F.; ASCIUTTO, K.; MARINI, D.; PORCEL, L.; DAL ZOTTO, A.; MANNA, M.E.; BELGORODSKY, L.; GIAYETTO, A.; ARROYO, L.; FARRANDO, R.; ANTENUCCI, M. y M. E. OJEDA. 2012. Situación de la sharka en Argentina. Análisis de semillas nº 21, vol 1, tomo 6.
- ROSSINI, M.; WAGNER, F.; EMILI, S.; ASCIUTO, K.; MARINI, D.; PORCEL, L.; RAIGÓN, J.; ARROYO, L. y A. DAL ZOTTO. 2009. Monitoreo de sharka en las regiones productoras de frutas de carozo de argentina. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Termas de Río Hondo, Sgo. del Estero. Octubre 2009.
- RUBIO, M.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. and F. DICENTA. 2008. Study of long-distance movement of *Plum pox virus* (sharka) as an alternative resistance-evaluation method in *Prunus*. Scientia Horticulturae. Published On-Line as DOI: 10.1016/J.scienta.2008.06.010.
- SAVULESCU, A. and A. MAKOVEI. 1965. Studies on the sharka (*Plum pox virus*) and related line pattern virus. Zastita bilja 16: 357-366.
- SCORZA, R.; MALINOWSKI, T.; MINOIU, N.; CAMBRA M. and M. RAVELONANDRO. 2004. Potential use of transgenic plums resistant to *Plum pox virus* field infection. Acta Hort. 657, 321-324.
- SERCE, C.U.; CANDRESSE, T.; SVANELLA-DUMAS, L.; KRIZBAI, L.; GAZEL, M. and K. CAGLAYAN. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in Ankara province of Turkey. Virus Research 142: 121-126.
- SHEVELEVA, A.; IVANOV, P.; PRIHODKO, Y.; VARGA, A.; JAMES, D. and S. CHIRKOV. 2012. *Plum pox virus* w appears to be the most variable strain of the seven recognized strains of the virus. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICVF). Roma, Italia. June 3-8, 2012. Pp. 35.
- SZIRMAI, J. 1961. Report on fruit tree virus diseases in Hungary. Tijdschrift Planteavl 65: 220-229.
- THOMPSON, D.; McCANN, M.; MacLEOD, M.; LYE, D.; GREEN M. and D. JAMES. 2001. First Report of *Plum Pox Potyvirus* in Ontario, Canada. Disease notes, Plant Disease, 85 (1): 97.
- VARVERI, C. 2006. Epidemiology of *Plum pox virus* strain M in Greece. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36: 276-278.
- VÍDAL, E.; ZAGRAI, L.; MILUSHEVA, S.; BOZHKOVA, V.; TASHEVA-TERZIEVA, E.; KAMENOVA, I.; ZAGRAI, I. and M. CAMBRA. 2012. Use of horticultural mineral oil treatments for the control of different *plum pox virus* isolates in nursery blocks. XXII 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICVF). Roma, Italia. June 3-8, 2012. Pp.74.
- WAGNER, F. 2010. *Plum pox virus* (enfermedad de sharka). Situación en Argentina. Estrategias de manejo y control. Informe técnico presentado en reunión de Comisión Interinstitucional. Bs. As., 28 de mayo de 2010.
- WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; RAVELONANDRO, M. and J. DUNEZ. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. Journal of Virological Methods 33: 355-365.
- WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUAIRE, G.; RAVELONANDRO, M. and J. DUNEZ. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *plum pox potyvirus* detection. Journal of Virological Methods 39: 27-37.
- ZAGRAI, I.; CAPOTE, N.; RAVELONANDRO, M.; CAMBRA, M.; ZAGRAI, L. and R. SCORZA. 2008. *Plum pox virus* silencing of c5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. J. Plant. Path. 90: 63-71.