



Detection and virus monitoring in stone fruit pomological collections in Buenos Aires province

Detección y monitoreo de virus en colecciones de frutales de carozo en la provincia de Buenos Aires

Arroyo, L. E.¹ y Valentini, G. H.¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria San Pedro, Ruta 9 km 170, B2930ZAA, Buenos Aires, Argentina. arroyo.luis@inta.gob.ar; valentini.gabriel@inta.gob.ar

Recibido: 13/06/2017

Aceptado: 20/02/2018

ABSTRACT

Arroyo, L. E. y Valentini, G. H. 2018. Detection and Virus monitoring in stone fruit pomological collections in Buenos Aires province. Horticulture Argentina 37 (92): 5-9.

In order to improve the quality of stone fruit propagation material, the San Pedro Experiment Station began a program of diagnosis and monitoring of its collections, in order to know its status regarding three Ilarvirus and one Potyvirus, and to identify healthy varieties. The diagnosis was made using the DAS-ELISA technique, with the recommended protocol for the corresponding kits. Samples were analyzed in duplicate and the results were read on a

Multiskan MS Labysistem reader. Absorbance readings (A 405) greater than three times the mean of the healthy controls were considered positive. Consistent composite samples of 8 leaves / 2 plants / variety selected from the four main branches were analyzed. PNRSV had an approximate average incidence of 30%, in the different collections monitored. PDV and ApCLSV were detected in less than 5%. No varieties or hybrids were affected by PPV or ApMV. 38 varieties of peach, 25 of nectarine and 37 of plum were negative to the analyzed viruses.

Additional Keywords: DAS-ELISA, peach, nectarine, plum, ilarvirus.

RESUMEN

Arroyo, L. E. y Valentini, G. H. 2018. Detección y monitoreo de virus en colecciones de frutales de carozo en la provincia de Buenos Aires. Horticultura Argentina 37 (92): 5-9.

Para mejorar la calidad del material de propagación de frutales de carozo, la EEA

San Pedro inició un programa de diagnóstico y monitoreo de sus colecciones, con el objeto de conocer su condición sanitaria con respecto tres Ilarvirus y un Potyvirus, e identificar variedades sanas a estos virus. El diagnóstico se realizó por medio de la técnica DAS-ELISA, con el protocolo

recomendado para los kits correspondientes. Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados fueron leídos en un lector Multiskan MS Labysistem. Se consideraron positivas las lecturas de absorbancia (A 405) superiores a tres veces la media de los testigos sanos. Se analizaron muestras compuestas consistentes de 8 hojas/2 plantas/variedad seleccionadas de cuatro ramas principales. PNRSV tuvo una incidencia promedio aproximada del 30%, en las diferentes

colecciones monitoreadas. Mientras que PDV y ApCLSV se detectaron en menos del 5%. No se detectaron variedades o híbridos infectados por PPV o ApMV. Se detectaron 38 variedades de duraznero, 25 de nectarina y 37 de ciruelo, libres de los virus analizados.

Palabras claves adicionales: DAS ELISA, duraznero, nectarina, ciruelo, ilarvirus.

1. Introducción

El Noreste de la provincia de Buenos Aires se caracteriza por una alta concentración de viveros. Según el INASE (Instituto Nacional de Semillas) existen en la zona alrededor de 150 viveros. Dichos establecimientos, en su gran mayoría producen plantas de exterior y dentro de dicho grupo se destacan los frutales de carozo.

La producción de frutales de carozo ha disminuido en los últimos años concentrándose en productores con acceso a tecnología.

Las plantas de frutales de carozo se producen con plantines provenientes de carozos recolectados fundamentalmente en la zona cordillerana de las provincias de Catamarca, La Rioja y en algunos casos de Salta. Las plantas son injertadas con variedades elegidas por el viverista directamente de plantaciones comerciales. Los viveristas no poseen, en general, lote de plantas semilleras ni yemeras. La Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA San Pedro se ha caracterizado por la introducción y caracterización de nuevas variedades, y en los casos de materiales de libre multiplicación, la distribución a productores de pequeñas cantidades de yemas de variedades que han demostrado buena adaptación en la colección oficial.

Las plantas del género *Prunus* son afectadas por un gran número de virus que ocasionan importante pérdida económica, entre los cuales los ilarvirus, ocupan un lugar relevante (Pallas et al, 2012). Trabajos anteriores en las principales zonas productoras de fruta de carozo reveló la presencia de los ilarvirus: Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV), Prunus Dwarf Virus (PDV) y Plum Line Virus (PLV) (Docampo et al 1990). Posteriormente Haelterman y Docampo (1998) también determinaron la presencia del Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ApCLSV) del grupo Trichovirus, que produce canchales en ramas de ciruelos y otros síntomas similares a los producidos por el Sharka, motivo por el cual se lo llama también falso sharka. El Sharka o Plum Pox Virus (PPV) fue diagnosticado por primera vez en la Argentina a finales del 2004 en un lote de ciruelos de San Juan y confirmada su presencia en enero de 2005 (Rossini et al, 2011). Relevamientos de PPV se han realizado también en otros países a causa de la gravedad y los riesgos que representa la enfermedad y su distribución (Mitrofanova et al 2015).

Como continuación de trabajos realizados anteriormente (Arroyo *et al.*, 1998), el objetivo de este estudio fue monitorear la presencia de los principales virus en la colección de frutales de carozo de la EEA San Pedro del INTA y seleccionar los materiales sanos. Esto permitirá mejorar la calidad del material de propagación que se emplea en la zona para la producción de plantas de frutales de carozo.

2. Materiales y métodos

Los materiales vegetales monitoreados corresponden a variedades de la colección de frutales de carozo de la EEA San Pedro. Dichos materiales corresponden a durazneros (*Prunus pérsica*) nectarinas (*Prunus pérsica* var *nectarina*), ciruelo (*Prunus salicina* y *P. domestica*), damascos (*Prunus armeniaca*) y cerezos (*Prunus avium*), así como a algunos híbridos empleados como portainjertos.

Se tomaron muestras compuestas de 8 hojas colectadas de 2 plantas/variedad. Si se contaba con 1 planta/variedad la muestra también consistió de 8 hojas. Las hojas se colectaron en primavera/verano de los cuatro puntos cardinales a partir de ramas principales. Las muestras compuestas se identificaron y conservaron en bolsas de polietileno y fueron mantenidas en una conservadora junto a geles refrigerantes hasta su traslado al laboratorio, el cual ocurrió dentro de las 4hs. Las muestras se mantuvieron por 72 hs en heladera hasta su procesamiento.

Durante 2009/10, 96 muestras se analizaron para PNRSV y PPV. En 2010/2011 se analizaron por PPV, ApCLSV, PDV y ApMV en 109 muestras y para PNRSV en 76 muestras. En 2011/12, 255 muestras se analizaron para los virus de PNRSV, PPV, PDV y ApCLSV.

Los análisis se realizaron mediante la técnica inmunoenzimática DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977). De cada hoja de la muestra compuesta se extrajo un círculo, con nervadura central, con sacabocados de aproximadamente 1,8 cm de diámetro y se maceraron conjuntamente en tampón de extracción 1:10 p/v, en frío.

Las muestras se analizaron por duplicado, empleando controles negativos (DAS-ELISA negativos) y controles positivos en cada placa correspondiente a plantas de campo previamente diagnosticadas, o a controles provistos en el Kit de la empresa BIOREBA. Las inmunoglobulinas (Bioreba AG) se emplearon según especificaciones de origen. Las reacciones fueron leídas en un lector Multiskan MS Labysistem. Se consideraron DAS-ELISA positivas las lecturas de absorbancia (A_{405}) superiores a tres veces la media de los testigos sanos.

3. Resultados y discusión

En ninguna de las muestras analizadas en las diferentes campañas se detectó la presencia de PPV. Tampoco se detectó la presencia de ApMV en las muestras analizadas durante la campaña 2010/2011.

El PNRSV (Cuadro 1) fue detectado en 18 muestras durante 2009/2010; 24 en 2010/11 y 84 en la 2011/2012. Según los resultados de las últimas dos campañas el porcentaje de infección con este virus es del orden del 30 %. El menor porcentaje detectado en la primera campaña se debió posiblemente a que uno de los pocos lotes muestreados en dicho periodo resultó ser el de menor porcentaje de infestación de la EEA.

Cuadro 1: Número de muestras compuestas positivas a PNRSV, PDV y ApCLSV mediante DAS-ELISA y periodo. Estación Experimental San Pedro, Buenos Aires, Argentina. 2009-2012.

Periodo	Número de muestras compuestas positivas		
	PNRSV	PDV	ApCLSV
2009/2010	18/96	--	--
2010/2011	24/76	4/109	5/109
2011/2012	84/255	14/255	11/255

PDV y ApCLSV (Cuadro 1) fueron detectados en porcentajes muy inferiores a los enunciados para el PNRSV. En el primer caso (PDV) fue detectado en 4 muestras en 2010/2011 y 14 en 2011/2012, lo cual indica un porcentaje de incidencia que varió de 3.5 a 5.5 durante un año. En el caso de ApCLSV las muestras positivas fueron 5 en 2010/2011 y 11 para 2011/2012, lo cual indica una incidencia anual de 4.5%.

De las mismas plantas (muestras compuestas) analizadas en 2010/2011 y 2011/2012, 2 muestras fueron nuevos positivos para PDV y una lo fue para ApCLSV.

Las muestras analizadas para PNRSV dieron resultados positivos crecientes a través de los períodos considerados; en 2010/2011 hubo 6 resultados nuevos positivos que en el período previo habían sido negativos. Algo similar ocurrió en 2011/2012, con 5 nuevos positivos que habían sido negativos en 2010/2011.

En 2010/2011 de 76 muestras analizadas para PNRSV, PDV y ApCLSV, 3 mostraron infección conjunta con dos virus: una con PNRSV + PDV y dos con PNRSV y ApCLSV. De las 255 muestras analizadas en la campaña 2011/2012, 12 (doce) dieron positivo para dos virus, 6 para PNRSV y PDV y otras 6 para PNRSV + ApCLSV. Una única muestra dio positivo para los tres virus PNRSV+ PDV+ApCLSV. Ninguna muestra dio positivo para la doble infección de PDV y ApCLSV.

De las 255 muestras analizadas en 2011/2012, 99 correspondieron a durazneros, 65 a ciruelos, 42 a nectarinos, 1 a cereza, 6 a damasco, y el resto a portainjertos o híbridos. El 42% de las muestras de durazneros dieron positivo a PNRSV, 10% a PDV y 9% a ApCLSV. En el caso de las nectarinas los porcentajes de incidencia fueron bajos con 24%, casi 5% y menos de 2,5% para PNRSV, PDV y ApCLSV, respectivamente. Para las variedades de ciruelo el único virus detectado fue el PNRSV en 37% de las muestras.

Las 99 muestras de duraznero correspondieron a 67 variedades (31 variedades se encuentran en más de un lote y fueron analizadas en forma independiente). Los resultados indican que se cuenta con material libre de los virus analizados en 38 variedades. Para nectarinas fueron analizadas 42 muestras correspondientes a 32 variedades (9 variedades se encuentran en más de un lote), de las cuales 25 fueron libres para los virus analizados. En ciruelos se analizaron 58 variedades (7 se encuentran en dos lotes) y se obtuvo 37 libres de los virus estudiados.

La infección del tipo de virus y frecuencia no fue consistente entre las mismas variedades pertenecientes a lotes distintos de la colección de la EEA San Pedro.

4. Conclusiones

En promedio, existe más de 50% de variedades e híbridos libres de los virus PNRSV, PDV y ApCLSV en las cinco especies frutícolas de carozo de la EEA, San Pedro. PPV y ApMV no fueron detectados en ninguna variedad analizada. La incidencia de PDV y ApCLSV fue muy baja y con limitado incremento en los 3 años del estudio.

Es importante iniciar en el corto plazo un programa de producción de yemas y/o plantas de identidad y sanidad controlada para beneficio de los productores y la región.

5. Bibliografía

Arroyo, L; Valentini, G.H.; Corbino, G. y Daorden, M.E. 1998. Primeras acciones para el establecimiento de una colección de Cvs de duraznos, nectarinas y ciruelos libres de virus.

XXI Congreso Argentino de Horticultura libro de resúmenes: 62
Clark, M. and Adams, A. 1977. Characteristics of microplates methods of Enzyme Linked Immunosorbent

- Assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virology, 34: 475-483.
- Docampo, D. M., Haelterman, R. M. y Guerra, G. D. 1990: Distribución del PNRSV, PDV, PLV en prunoideas de áreas frutícolas de la República Argentina. - RIA Vol.XXII N°1 PP 280-285
- Haelterman, R. y Docampo, D. 1998. Presencia del virus de las manchas foliares cloróticas del manzano (apple chlorotic leaf spot virus) en tres áreas de Argentina. XXI Congreso Argentino de Horticultura libro de resúmenes: 70.
- Mitrofanova, I., Mitrofanova, O. Chirkov, S., Lesnikova, N, Sedoshenko, S. and Chelombit, S. 2015: Detection and identification of Plum Pox Virus on Prunus species in Crimea. Agriculture & Forestry, Vol. 61, Issue 4: 197-204, 2015, Podgorica
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Amari, K., Sanchez-Pina, M. A., Myrta, A., And Sanchez-Navarro, J. A. 2012. Ilarviruses of Prunus spp.: A continued concern for fruit trees. Phytopathology 102:1108- 1120
- Rossini M, Wagner, F.; Ascitutto, K.; Marini, D.; Porcel, L.; Dal Zotto, A.; Manna, M.; Belgorodski, L.; Giayetto, A.; Arroyo, L.; Farrando, R.; Ojeda, M.; 2011: Análisis de la presencia de Sharka en plantas madres del género *Prunus* en Argentina. Resúmenes IV Encuentro tres Fronteras y II Encuentro Internacional Sin Fronteras en el cultivo de Duraznero. Mendoza, 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2011.