

IV. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS Y ORGANISMOS AFINES EN FRUTALES DE CAROZO EN URUGUAY

Diego C. Maeso Tozzi

IV.1 INTRODUCCIÓN

Hasta la década de los noventa, se habían reportado pocas enfermedades causadas por virus u organismos afines en frutales de hoja caduca en Uruguay (Koch, 1981). En su mayoría, la determinación de las mismas se basó en la descripción de síntomas, no contándose con un conocimiento completo de su distribución e incidencia en la producción, como tampoco de la presencia de desórdenes similares cuyos síntomas no son tan conspicuos. En ese sentido, los síntomas de este tipo de enfermedades muchas veces son confundidos con otros problemas patológicos, causados por hongos, bacterias e incluso, con deficiencias nutricionales.

Generalmente, los perjuicios ocasionados no son evidentes o son enmascarados por daños de otro origen, por lo que en su valoración por parte de productores o técnicos, generalmente son subestimados o relegados ante problemas en el cultivo de mayor importancia inmediata.

En 1986, la Estación Experimental Las Brujas, en ese entonces dependiente del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, incluyó entre las líneas de trabajo de un convenio suscrito con la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA), el estudio de las virosis y enfermedades afines en frutales de hoja caduca. La finalidad perseguida era determinar la presencia y evaluar los daños ocasionados por este tipo de enfermedades a nuestra fruticultura, así como proveer de materiales saneados que pudieran servir de inicio para una propagación masiva de materiales de alta calidad genético-sanitaria.

Al formarse el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria esta área de estudio fue priorizada y respaldada, obteniéndose la información incluida en este trabajo.

Las enfermedades tratadas aquí se denominarán por el nombre genérico de «virosis» incluyendo en ese término, tanto a las provocadas por virus como por organismos afines (viroides, fitoplasmas, u otros procariones) pero que tienen como característica principal, la capacidad de transmitirse por propagación vegetativa.

IV.2 VIRUS DE LA MANCHA NECROTICA ANULAR DE LOS *Prunus* (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV)

Es uno de los virus más importantes y de mayor distribución de los frutales de carozo a nivel mundial y por lo tanto, uno de los contaminantes más comunes de los materiales propagativos.

IV.2.1 Agente causal

Prunus necrotic ringspot virus es un virus poliédrico con partículas de 20-30 nm de diámetro miembro del género *Illarvirus* («isometric labile ringspot virus», o sea virus isométricos con partículas sensibles a temperatura que causan manchas anulares) al cual pertenecen también otros agentes que afectan frutales de carozo y con los cuales tienen estrecha relación.

Por ejemplo, algunas cepas de ApMV (virus del mosaico del manzano, *Apple mosaic virus*) reaccionan con antisueros preparados para PNRSV y viceversa.

Fue uno de los primeros virus de frutales en ser purificado (Fulton, 1970).

IV.2.2 Síntomas

No existe un único síntoma relacionado con la infección por PNRSV. El daño que provoca depende de la especie, cultivar, virulencia de la cepa, y su interacción con otros virus. Por eso, en la actualidad se ha demostrado que cerca de 27 enfermedades descritas en un principio como diferentes son causadas por PNRSV (ej. recurrent necrotic ringspot, necrotic ringspot, cherry rugose mosaic, almond calico, enfermedad de Stecklenberger, etc., Gilmer, 1976).

También algunos mosaicos en manzanos, rosales, ciruelo y lúpulo, son provocados por razas de este virus.

Provoca daños serios en viveros causando bajo prendimiento de injertos, disminución del vigor de plantines y fallas en enraizamiento de estacas. Al respecto, en los Cuadros 1 al 3 se presentan algunos datos experimentales nacionales. Se muestra el efecto de la infección por este virus en el desempeño de plantas de vivero del duraznero cultivar Rey del Monte sobre el portainjerto de semilla 'Pavía Moscatel' en un experimento realizado en 1995 en INIA Las Brujas.

Como se observa, este virus provoca considerables efectos negativos sobre el prendimiento y posterior desempeño de la planta de vivero fundamentalmente si la infección está presente en el portainjerto.

Cabe señalar que la infección de los portainjertos fue lograda en forma natural en plantines provenientes de semillas cosechadas de plantas infectadas.

Si bien esos datos deben tomarse solo como orientación, dadas las limitaciones en cuanto a cantidad de repeticiones incluidas en el experimento, se considera que es un antecedente a considerar que refuerza la importancia de

Cuadro 1. Efecto de PNRSV sobre el prendimiento en vivero del duraznero 'Rey del Monte' injertado sobre 'Pavía Moscatel'. INIA Las Brujas, 1995. (Maeso, 1997c).

Estado sanitario portainjerto/cultivar	Prendimiento de yemas (Yemas prendidas/yemas injertadas)		
	1 ^a . injertación 3 septiembre 1996	2 ^{da} . injertación 19 diciembre 1997	Acumulado
Negativo ¹ /PNRSV ²	5/20	8/15	13/20 (65%)
Negativo/negativo	6/19	6/13	12/19 (63%)
Subtotal Portainjerto negativo	11/39 (38%)	14/28 (50%)	25/39 (64%)
PNRSV/PNRSV	2/9	3/7	Muerte de la mayor parte del tratamiento.
PNRSV/Negativo	1/10	2/9	Ídem.
Subtotal Portainjerto con PNRSV	3/19 (16%)	5/16 (31%)	

¹ Negativo = sin detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA.

² PNRSV= PNRSV detectado mediante la prueba DAS-ELISA.

Cuadro 2. Efecto de PNRSV sobre el diámetro y supervivencia de plantas de vivero en duraznero 'Rey del Monte' injertado sobre 'Pavía Moscatel'. INIA Las Brujas, 1995. (Maeso, 1997c).

Estado sanitario portainjerto/cultivar	Altura de planta pre-injerto (cm)	Diámetro promedio de planta (mm)			Número de plantas vivas/ número inicial abril 1997
		Pre-injerto	diciembre 1996	abril 1997	
Negativo ¹ /PNRSV ²	95	17	17	19	5/20
Negativo/negativo	101	20	20	23	12/19
Subtotal Portainjerto negativo	98	18	19	22	17/39
PNRSV/PNRSV	69	12	12	---	1/9
PNRSV/Negativo	73	12	12	---	1/10
Subtotal Portainjerto con PNRSV	71	12	12	---	2/19

¹ Negativo = sin detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA.

² PNRSV= PNRSV detectado mediante la prueba DAS-ELISA.

seleccionar sanitariamente los materiales de propagación a utilizar en la industria viverística. Además, estos resultados y otros de trabajos posteriores, concuerdan con lo registrado en otras regiones (Uyemoto *et al.*, 1992, Pusey y Yadava, 1991).

En ese sentido, en un relevamiento posterior realizado en viveros comerciales se observa similar tendencia. En el cuadro 4 se observa una asociación entre la detección de PNRSV en las plantas dadoras de yemas (plantas madre) y en la planta de vivero resultante, con los porcentajes de prendimientos registrados por el viverista.

Cuadro 3. Efecto de PNRSV sobre el vigor de plantas de vivero en duraznero 'Rey del Monte' injertado sobre 'Pavía Moscatel'. INIA Las Brujas, 1995. (Maeso, 1997c).

Estado sanitario portainjerto/ cultivar	Largo de brotes acumulado (cm) diciembre 1996	Número de brotes del porta-injerto	Largo de brotes del portainjerto acumulado (cm) 28 enero de 1997	Largo de brotes del cultivar acumulado (cm) 28 enero de 1997
Negativo ¹ /PNRSV ²	61	122	4436	119
Negativo/negativo	385	136	5172	953
Subtotal Portainjerto negativo	446	258	9608	1072
PNRSV/PNRSV	---	44	1514	6
PNRSV/Negativo	---	48	1700	4
Subtotal Portainjerto con PNRSV	---	92	3214	10

¹ Negativo = sin detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA.

² PNRSV= PNRSV detectado mediante la prueba DAS-ELISA.

Cuadro 4. Relación entre la infección con PNRSV y el prendimiento en plantas de frutales de carozo en un vivero comercial. Melilla, 2004.

Cultivar	Porcentaje de plantas con PNRSV/total analizado		Porcentaje de prendimiento 2003 (%)	Porcentaje de plantas con PNRSV/ total analizado
	Dadoras de yemas	Vivero 2003		Vivero 2004
'Junegold'	80 (4/5)	80 (4/5)	80	80 (4/5)
'Carolina'	60 (3/5)	0 (0/5)	87	0 (0/5)
'EarliGrande'	100 (5/5)	80 (4/5)	58	80 (4/5)
'Fayette'	--	100 (5/5)	60	100 (5/5)
'Flavorcrest'	80 (4/5)	100 (5/5)	48	0 (0/3)

Como regla general, se acepta que en infecciones virales, cuanto más temprano ocurren en la vida de una planta, mayor es su severidad.

En árboles adultos, PNRSV también reduce el crecimiento y afecta los rendimientos dependiendo la magnitud de estos efectos de la cepa del virus y de la variedad/portainjerto del huésped.

Según Desvignes (1999), existen numerosas cepas de PNRSV relacionadas serológicamente pero con diferente nivel de virulencia. Generalmente PNRSV produce clorosis foliar, mosaico (Figura 1A), estrías o dibujos en los pétalos de las flores de durazneros (Figura 1B), necrosis (de yemas, hojas, ramas y raíces), deformación de hojas (epinastia, enroscado, rugosidad, enaciones o sea sobrecrecimientos, y enanismo total o parcial de la planta).

Los daños en follaje generalmente se observan en hojas pequeñas aun no desdobladas, en forma de manchas necróticas con perforado (Figuras 1 C-D).

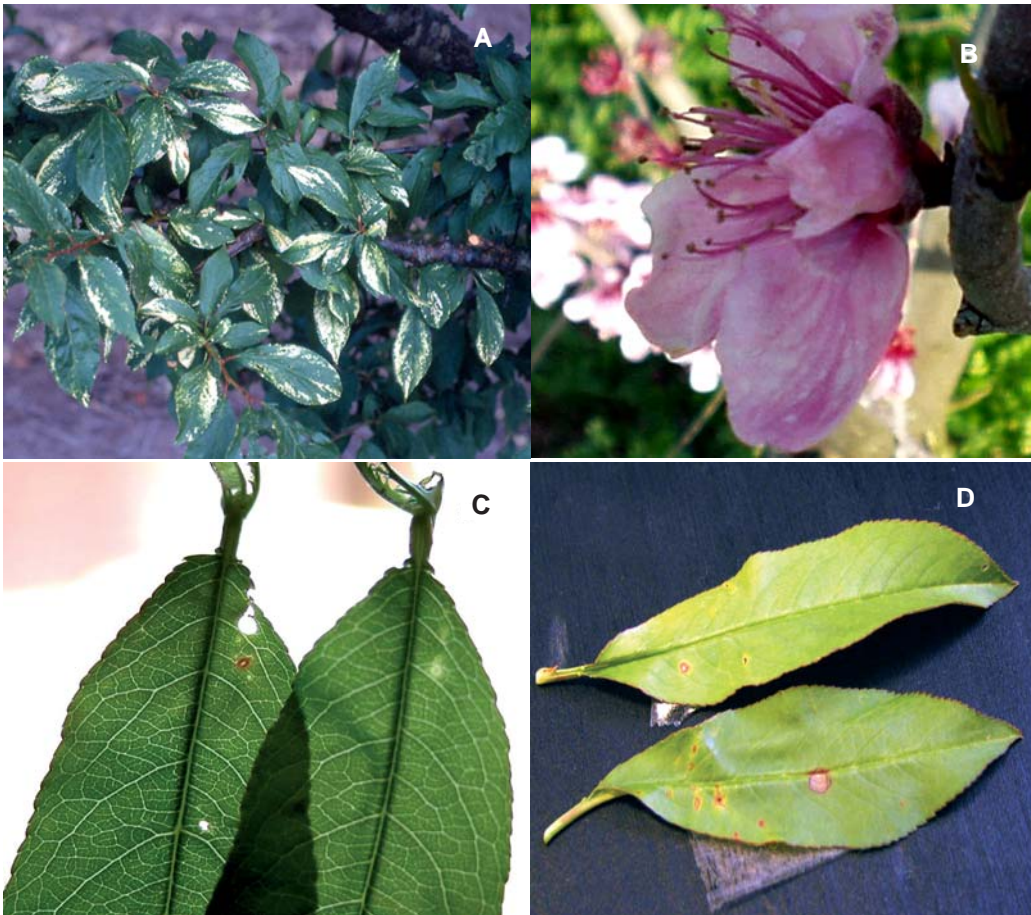


Figura 1. Algunos síntomas asociados a la infección con PNRSV observados en Uruguay. A. Mosaico en ciruelo 'Golden Japan'. B, C y D. Dibujos en pétalos, lesiones locales con y sin cribado respectivamente, en el cv. 'EarliGrande'.

Este síntoma es el más frecuente y su descripción da origen al nombre de este virus en inglés.

En nuestro país es muy común, temprano en la primavera, la aparición de manchas necróticas con perforado en durazneros las que generalmente son atribuidas a ataques de la mancha bacteriana (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), enfermedad también muy frecuente y severa. Sin embargo, la ocurrencia de cribado y lesiones que pueden confundirse con las provocadas por mancha bacteriana en cultivares en los que sistemáticamente se detecta PNRSV por serología (por ej. el cv. 'EarliGrande', Figura 2), sumado a que su aparición disminuye a medida que avanza la temporada y aumentan las temperaturas, hace sospechar que este tipo de desórdenes tengan origen viral.

La remisión (disminución) de síntomas al aumentar la temperatura es característico del grupo de virus al que pertenece PNRSV. En la generalidad las variedades de duraznero, la presencia de estos síntomas necróticos no es muy fuerte y si no se examina el follaje cuidadosamente, ellos pasan desapercibidos, notándose simplemente la defoliación y pérdida de área foliar.

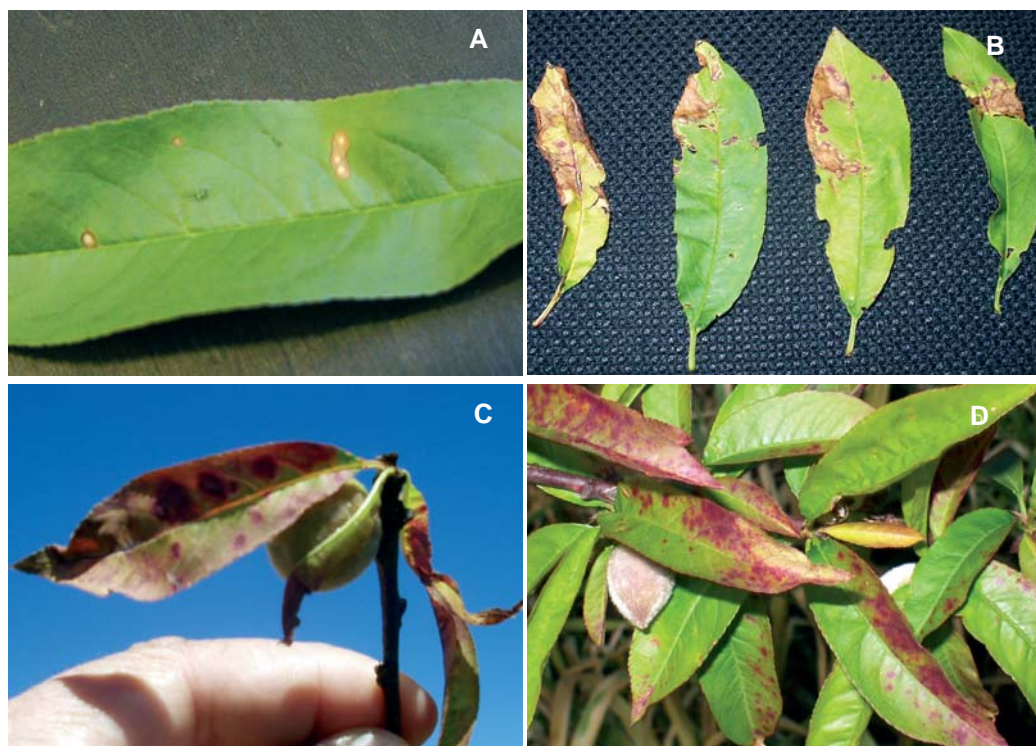


Figura 2. Síntomas de enrojecimiento y cribado de hojas asociados con la detección de PNRSV en duraznero 'EarliGrande'.

En el desarrollo de la enfermedad en la vida de una planta se mencionan dos etapas (Desvignes, 1999; Giunchedi, 2003). En las primeras temporadas luego de ocurrida la infección, se produce la denominada etapa de «shock» y luego se pasa a una etapa «crónica» en la cual los daños se atenúan si no existen infecciones con otros virus que agraven el daño.

Sin embargo, se puede presentar una gran variedad de síntomas dependiendo de la sensibilidad de las variedades, variabilidad del virus y condiciones ambientales. Sobre éste último, la investigación nacional indica que en Uruguay, si las primaveras son frescas es más común observar los desórdenes asociados con estos virus.

En base a diferencias en síntomas se han descrito cuatro enfermedades causadas por PNRSV (Desvignes, 1999; Giunchedi, 2003; Gilmer *et al.*, 1976):

1) Mancha necrótica anular. Es la más distribuida, muestra las etapas de *shock* y luego la crónica con la casi desaparición de síntomas. La recuperación depende del huésped, del aislamiento del virus y de las condiciones ambientales. En duraznero, cuando la infección se registró la temporada anterior, se produce retardo en la brotación, muerte de yemas de hoja y de flor, de algunas ramas del año y se producen canchales. Las hojas que brotan muestran algunos anillos oscuros o áreas cloróticas que se vuelven necróticas, deformándolas hasta que finalmente caen. Luego los síntomas desaparecen, el árbol brota normalmente, salvo la presencia de algunas manchas necróticas, pero puede

reducir su vigor y su rendimiento, retardando la maduración y provocando el rajado de frutos en la sutura.

2) Mancha necrótica anular recurrente. Se da fundamentalmente en cerezo ácido. Los síntomas son similares a los anteriores con la diferencia que la etapa de shock se repite varias veces en la vida del árbol.

3) Raza del mosaico rugoso del cerezo dulce. Se diferencia de las anteriores porque en cerezo dulce los síntomas de «shock» son seguidos por la aparición de un mosaico rugoso, manchas cloróticas en las hojas, enaciones y retardo en la floración y la maduración de frutos. En durazneros, los aislamientos que provocan este síntoma también producen una etapa inicial de «shock» y arrosetamiento de brotes en las ramas principales. Los árboles enfermos se recuperan, pero en temporadas posteriores siguen mostrando manchas necróticas en las hojas. En el ciruelo japonés 'Shiropium' provoca mosaicos, líneas y hoja de roble similar a los síntomas causados por el «plum line pattern». En Uruguay, en el cv. 'Golden Japan' en la colección de INIA LB se ha detectado serológicamente PNRSV en plantas con síntomas similares a los descritos (Figura 1 A). Aprovechando la existencia en INIA de otro origen del mismo cultivar, el cual no estaba infectado de PNRSV se compararon grupos de diez plantas inoculadas y sin inocular sobre portainjertos 'Pavía Moscatel' en el período 1993-1997.

En la Figura 3 se puede apreciar la evolución del diámetro de tronco y del peso de poda de uno y otro conjunto de plantas.

4) Almond calico. En hojas de almendro produce manchas o áreas cloróticas de color blanco o amarillo muy claro, así como falla en la brotación de las yemas. También afecta cerezo, duraznero y ciruelo japonés.

Giunchedi, (2003), menciona que los frutos de algunos cultivares de duraznero, fundamentalmente aquellos de maduración precoz pueden presen-

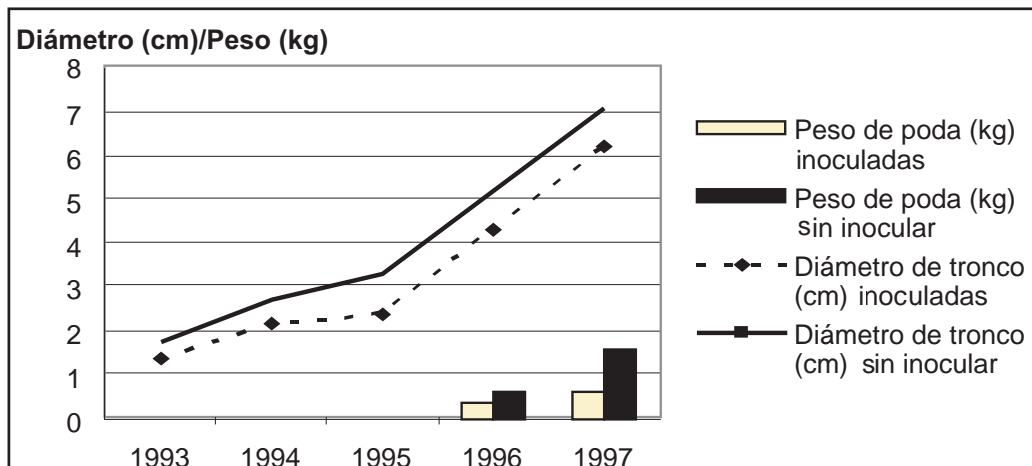


Figura 3. Influencia de la infección con PNRSV causante de mosaico (plum line pattern), sobre la evolución del peso de poda y diámetro de planta en el ciruelo japonés 'Shiropium' injertado sobre 'Pavía Moscatel'. Promedio de diez plantas cada grupo.

tar dibujos y coloración anormal. En plantas de la variedad 'EarliGrande' en la zona de Melilla se han observado síntomas que concuerdan con esa aseveración (Figura 4).



Figura 4. Anillos de colores en frutos del cv. 'EarliGrande' asociados con la infección por PNRSV.

IV.2.3 Transmisión

El mecanismo principal de transmisión es por injerto, sobre todo si se tiene en cuenta que generalmente no se observan síntomas evidentes en las plantas infectadas.

La transmisión por injerto es muy efectiva y se registra aunque el inóculo muera una vez cumplido un tiempo mínimo de contacto entre tejidos. Al respecto, Giunchedi (2003) menciona que la transmisión se registra aún después de la muerte de una yema infectada injertada y de la reacción de hipersensibilidad en el patrón en forma de producción de exudados gomosos.

También se ha comprobado la transmisión a huéspedes perennes mediante cortes y lesiones en corteza o por frotado de inóculo en el cambium, corteza y tejidos subyacentes (Uyemoto, Rowhani y Luhn, 1996).

A nivel experimental, el virus se transmite fácilmente por savia en forma mecánica a numerosos huéspedes herbáceos habiendo sido ésta una forma de detectarlo durante muchos años (ver detección).

La transmisión por polen fue demostrada en cerezo por Ehlers y Moore, (1957) y Way y Gilmer, (1958), confirmando también la infección de la descendencia a través de este mecanismo. Bernhard, Saunier y Marenaud (1975) reportan para durazneros, poca transmisión por polen en los primeros cinco

años aumentando después del sexto de forma tal que al octavo año el 80 % de los árboles estaba infectado, mientras Uyemoto *et al.* (1992) y Pusey y Yadava (1991) establecen porcentajes de transmisión muchos más elevados y rápidos.

A través de este mecanismo se puede infectar la semilla formada o al árbol sano. El virus es llevado en la superficie del grano de polen, por lo que se supone que éste no necesita germinar para infectar al árbol receptor, pudiéndose realizar una especie de inoculación mecánica de la flor por parte de las abejas o trips (Greber *et al.*, 1991; Uyemoto *et al.*, 1992).

En nuestro país, al comienzo de los trabajos de investigación en virus, luego de analizar el mismo grupo de plantas durante varias primaveras consecutivas (1992-1997) se sospechó la ocurrencia de este tipo de transmisión, ya que la detección de este virus aumentaba año a año (Maeso, 1997b). En efecto, en ese período fue verificado el aumento del número de árboles en los que se detectó PNRSV por ELISA estudiando tres grupos de árboles de duraznero ubicados en el campo experimental de INIA LB. El primer grupo lo constituían 27 plantas del bloque semillero del portainjerto 'Pavía Moscatel', y los dos grupos restantes, eran árboles de la colección de cultivares de duraznero. En el Cuadro 5 se muestra la evolución de la detección y su magnitud.

Cuadro 5. Evolución de la infección con PNRSV en tres grupos de plantas de duraznero en el campo experimental de INIA LB. Período 1992-1997. (Maeso, 1997b).

AÑO	Plantas del portainjerto 'Pavía Moscatel'. (27 árboles)		Plantas de cultivares comerciales grupo 1 (32 árboles)		Plantas de cultivares comerciales grupo 2 (67 árboles)	
	Número de plantas con PNRSV	Porcentaje	Número de plantas con PNRSV	Porcentaje	Número de plantas con PNRSV	Porcentaje
1992	9	33				
1993	9	33				
1994	18	67				
1995	22	81	9	28	52	78
1996	25	93	15	47	59	88
1997	25	93	17	53	62	92

PNRSV también se transmite por la semilla producida por plantas infectadas en cerezo, duraznero, damasco, ciruelo y almendro.

En Uruguay, en 1992 fue detectada esta virosis en plantines de portainjerto sin injertar provenientes de semilla en dos viveros comerciales (Cuadro 6, Maeso, 1995) . Ese hecho sugeriría la existencia de transmisión por semilla en nuestras condiciones, por lo menos en el cultivar 'Pavía Moscatel'.

Cuadro 6. Detección de PNRSV en análisis individual y grupal por la prueba ELISA en plantines del portainjerto 'Pavía Moscatel' en dos viveros comerciales, 1992. (Maeso, 1995).

Vivero comercial	Porcentaje de detección de PNRSV. Análisis individual	Número total de plantas analizadas	Porcentaje de detección de PNRSV Análisis en grupo. (Cinco plantas/grupo)	Número total de plantas analizadas
1	58	40	11 - 58	200
2	9	30	6 - 30	150

Aprovechando la existencia de plantas de la variedad 'Pavía Moscatel' con y sin infección con PNRSV se realizaron dos experimentos en 1993 y 1995 en los que se colectaron sus semillas por separado, se plantaron y se analizó la sanidad de los plantines resultantes.

En los Cuadros 7 a 9 se muestran los resultados de la detección de PNRSV en análisis individuales o en grupos. Se confirmó la infección con este virus de cierto porcentaje de los plantines provenientes de semilla colectada de plantas infectadas (10-30%). En el caso de plantines provenientes de semilla cosechada de plantas en las que no se detectó este virus, PNRSV fue detectado únicamente en un plantín en el experimento de 1995, siendo este valor porcentualmente muy bajo (no se muestran todos los resultados).

Respecto a la transmisión por la semilla, Giunchedi (2003) menciona que: «la infección de la semilla puede derivar tanto por la presencia de partículas virales en el aparato ovárico como por la introducción en el saco embrionario a través del polen, durante el proceso de fecundación; y por lo tanto es posible obtener semilla infectada también de árboles sanos».

Cuadro 7. Detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA en plantines de duraznero 'Pavía Moscatel' hijos de plantas infectadas con ese virus, analizados en grupos, 1993. (Maeso, 1997b).

Planta madre con PNRSV	Número de grupos	Plantines por grupo	Total de plantines analizados	Número de grupos donde se detectó PNRSV	Infección mínima y máxima (%) [*]
14	20	5	100	4	4 - 20
18	20	4	80	6	8 - 30
19	20	2	40	0	0
20	20	2	40	3	8 - 15
21	10	2	20	0	0
Total	90	---	280	13	5 - 14

^{*} Porcentajes mínimos y máximos de infección estimados suponiendo que solamente uno o todos los plantines del grupo estén infectados.

Cuadro 8. Detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA en plantines de duraznero 'Pavía Moscatel' hijos de plantas infectadas y no infectadas por ese virus, analizados individualmente en 1993. (Maeso, 1997a).

Planta madre con PNRSV	Número de plantines analizados	Nº de plantines con detección de PNRSV	Porcentaje
1	10	1	10
2	10	1	10
3	10	2	20
Total	30	4	13
Planta madre sin PNRSV			
4	10	0	0
5	10	0	0
6	10	0	0
Total	30	0	0

Sin duda, el mecanismo más efectivo para la transmisión de PNRSV (también aplicable para *Prune dwarf virus* PDV) en frutales de carozo es a través de material propagativo infectado. Sin embargo, estos virus tienen, aunque con menor eficiencia, la capacidad de diseminarse planta a planta dentro de un monte comercial, mediante polen, y a su descendencia, por la semilla.

Aún no está muy dilucidado cómo es el proceso de infección a través de polen/semilla pero su ocurrencia está comprobada con datos experimentales. Giunchedi (2003) menciona que en experimentos de transmisión usando polinización manual en cerezo ácido, se obtuvo semilla infectada pero la infección no se diseminó en el árbol, lo cual se explicaría por la existencia de un aislamiento anatómico entre el embrión y los tejidos de la planta madre el cual en condiciones naturales puede ser superado.

Actualmente existe evidencia experimental que indica la transmisión de PNRSV y PDV por acción de trips (en particular *Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis*) a plantas herbáceas. Estos insectos al alimentarse, transmitirían las partículas existentes en los granos de polen a los tejidos florales y hojas (Greber *et al.*, 1991), por lo que se presume que los trips juegan un papel importante en la transmisión de estos virus al alimentarse de polen de plantas enfermas contaminado con virus y lo llevan a flores de plantas sanas, inoculando las mismas. De esta forma, los trips inocularían y lograrían infectar tejidos florales de diversas especies, con lo cual se saltean las barreras naturales de la polinización.

Cuadro 9. Detección de PNRSV por la prueba DAS-ELISA en plantines de duraznero 'Pavía Moscatel' hijos de plantas infectadas y no infectadas por ese virus (Análisis en grupos y posteriormente análisis individual, 1995). (Maeso, 1997a).

Planta madre sin detección de PNRSV 1994	Número de plantines analizados	Porcentaje de plantines con detección de PNRSV
1	8	0
2	9	0
4	12	0
6	42	2
7	19	0
8	17	0
9	3	0
Subtotal: 7	110	0,91
Planta madre con detección de PNRSV 1994	Número de plantines analizados	Porcentaje de plantines con detección de PNRSV (%)
3	6	0
11	16	0
12	17	29
13	17	12
15	10	10
16	32	22
17	6	17
18	12	0
20	14	0
21	10	20
22	18	6
Subtotal: 11	158	12
Total: 18	268	7,5

IV.2.4 Métodos de detección

De los varios métodos para la detección de PNRSV, se mencionarán los más importantes y en forma cronológica en cuanto a su evolución.

Por mucho tiempo se pensó que eran varios los virus involucrados.

Como se mencionó, en un principio se conocía únicamente que estas enfermedades eran transmisibles por injerto y para diagnosticarlas se usaban cultivares sensibles que mostraban reacciones severas y bien claras, asociables con la presencia del agente causal.

Luego el avance científico hizo disponible técnicas más precisas, rápidas y sensibles para la detección de éste y otros virus de frutales de carozo, siendo, en la actualidad, sorprendentes los avances logrados en esta área.

En INIA LB se han realizado ajustes a algunas de esas técnicas para la detección viral en nuestras condiciones.

1) Injerto en indicadoras leñosas

Una de las primeras acciones de INIA en el transcurso de las actividades tendientes a conocer y ajustar la detección de virus en frutales de hoja caduca en Uruguay fue la introducción de una colección de indicadoras leñosas para los principales problemas a nivel mundial. Esa introducción se realizó en 1992 desde el hoy llamado NRSP-5 (National Research Support Project 5, <http://nrsp5.prosser.wsu.edu>) de la Universidad de Washington en Prosser. Esos materiales se mantienen aún hoy bajo malla en INIA LB.

Respecto a PNRSV, al injertar material infectado en plantines del duraznero 'GF 305' o 'Elberta', las cepas severas producen necrosis en hojas, principalmente en su nervadura central, manchas cloróticas, necróticas o anillos, y luego necrosis de brotes (Figura 5). Si la cepa de PNRSV es moderada, sólo se observará un crecimiento menor. Para ajustar la prueba a nuestras condi-



Figura 5. Detección de virus utilizando plantines del cv. 'GF 305'. A. Vista de un grupo de plantines de 'GF 305' injertados con material a analizar. B. Síntoma de aclarado de nervaduras (inóculo cv. 'Junegold'). C. Síntoma de deformación foliar y cribado de hojas (inóculo del cv. 'Mr.S 2/5'). D. Síntoma de aclarado de nervaduras y deformación foliar (inóculo cv. 'Springcrest').

ciones se plantó un pequeño bloque semillero de estas indicadoras leñosas a las que se colectó semilla, y se sembró en macetas en invernadero para lograr los plantines que oportunamente se inoculan con el material a analizar.

Otra indicadora que se utilizó para estos fines y que permite detectar además de PNRSV muchos otros virus fue *Prunus tomentosa* (Figura 6).



Figura 6. Síntomas en *Prunus tomentosa* derivados de la infección con PNRSV o PDV.

Más rápida que las anteriores, otra prueba de diagnóstico mediante injerto en indicadoras leñosas, pero que no discrimina entre la presencia de PNRSV o PDV es el injerto en plantas del cerezo de flor 'Shirofugen' (*Prunus serrulata*).

Si la muestra a analizar contiene alguno de estos virus, en menos de 30 días se observa necrosis alrededor de la zona donde se injertó una yema del mismo, con posterior exudado de goma e incluso muerte de la rama inoculada (Figura 7).

Uno de los problemas en Uruguay para desarrollar esta técnica de detección fue la falta de portainjertos para propagar el cv 'Shirofugen' y la poca supervivencia de éste en condiciones de campo ante otros problemas patológicos.

Para solucionar esa limitante, en INIA LB se ajustó la prueba realizando su propagación *in vitro* con posterior autoenraizado e inoculación en invernadero (Maeso y Castillo, 1997).

En un trabajo de ajuste realizado en 1995 se obtuvo una correlación casi total entre la detección con cerezo 'Shirofugen' y por la prueba ELISA (Cuadro 10).



Figura 7. Detección de PNRSV o PDV mediante injerto en cerezo ‘Shirofugen’. A. Indicador cultivado *in vitro*. B. Injerto de material a analizar. C. Reacción necrótica local en la región de injerto. D. Plantines de indicador listos para la prueba. E. y F. Gomosis derivada del injerto con material infectado.

Cuadro 10. Análisis de virus en frutales de carozo mediante injerto en *P. serrulata* cv. 'Shirofugen'.

Muestra	Resultado test ELISA previo (primavera 1994) ¹	Resultado test biológico Shirofugen (abril 1995) ²
DURAZNEROS		
Summerset 1	PNRSV	+
Summerset 2	PNRSV	+
O'Henry 1	PNRSV, PDV	+
O'Henry 2	PNRSV, PDV	+
Forastero	-	-
Flordaking	-	+
Fayette 1	PNRSV, PDV	+
Fayette 2	PNRSV	+
Springcrest	PNRSV	+
Rey del Monte	-	-
Flavorcrest	-	-
EarliGrande	PNRSV	+
CIRUELOS		
Oishiwase Sumomo	-	-
Rosa Grande	-	-
Soledad	-	+
Tricerri	PNRSV	+
Santa Rosa TT ³	-	-
Shiro TT	-	-
Stanley	-	-
Burbank	-	-
Golden Japan	PNRSV	+
Shirofugen sin inocular	-	-

¹ PNRSV = detección con antisuecos para *Prunus necrotic ringspot virus*.PDV = idem para *Prune dwarf virus*.² Dos repeticiones por muestra, ambas indicadoras inoculadas exhibieron igual reacción.³ TT= termoterapia.

2) Inoculación mecánica en plantines de pepino y otras plantas herbáceas.

Este método es eficaz usando tejidos tiernos (pétalos, brotes) temprano en la temporada. Esos tejidos se maceran en presencia de un tampón con sustancias que prevengan la degradación de los virus y luego este macerado se aplica a las hojas de plantas herbáceas entre las que se destacan el pepino, el calabacín y *Chenopodium* spp.

Es muy conveniente que las plantas a inocular permanecieran por lo menos 24 horas en oscuridad antes y luego de la inoculación. Luego de un tiempo variable (en pepino a los tres a cinco días), se observan manchas cloróticas difusas en los cotiledones de plantas inoculadas, luego el ápice se muere y no se forman hojas verdaderas (Figura 8).



Figura 8. Síntomas de PNRSV en plantines de pepino.

3) Serología.

Existen en el mercado varias empresas que ofrecen antisueros que permiten una fácil, rápida y correcta detección de PNRSV mediante la prueba ELISA. Utilizando esta técnica, se realizaron en INIA LB numerosos análisis de materiales de propagación y de montes comerciales locales lo cual ha permitido conocer la distribución y prevalencia de varias virosis que afectan frutales de carozo.

En el Cuadro 11 se pueden observar los resultados obtenidos en diferentes etapas en el período 1992-2005.

Si se toma en cuenta el tamaño relativo de la fruticultura uruguaya y los orígenes de los materiales propagativos, se puede suponer que algunos de ellos llegaron infectados a Uruguay (p.ej. 'EarliGrande'), ya que a lo largo del período, PNRSV ha sido detectado en todas las plantas analizadas de diferentes zonas, mientras que otros cultivares (por ej. 'Junegold') fueron infectados en nuestras condiciones dado que la detección de este virus aumentó en el período.

Otro aspecto a destacar es la diversidad de los orígenes, ya que por ejemplo en el caso de la variedad 'Rey del Monte', en donde existen diferentes «clones» también el grado de infección con PNRSV es variable.

Cuadro 11. Detección de PNRSV en diferentes cultivares de duraznero, nectarina (N) y ciruelo (C) en el período 1992-2005.

Cultivar	1992			1993			2001			2005		
	N° de predios	N° de muestras	Porcentaje de detección PNRSV	N° de muestras	Porcentaje de detección PNRSV	N° de predios	N° de muestras	Porcentaje de detección PNRSV	N° de predios	N° de muestras	Porcentaje de detección PNRSV	
EarliGrande	4	20	100	3	100	1	3	100	1	5	100	
Rey del Monte	8	40	45 (0-100)*	3	0				3	15	7 (0-20)	
Junegold	2	10	10	3	67	1	3	67	3	15	75 (40-100)	
Pavía Manteca	2	10	70 (40-100)									
Springcrest				3	100							
Summerset				3	100							
Flavorcrest				3	33				3	15	27 (0-60)	
Fayette				3	67							
O'Henry				3	100	1	3	100				
Flordaking				3	0							
Forastero				3	0	2	2	0				
Golden Japan (C)				3	100							
Vilha Nova						1	1	100				
Opedepe						1	6	0				
Ruby Sweet (C)						1	1	0				
Scarlet Pearl						1	1	100				
Sun Wright (N)						1	1	0				
Tropic Snow						1	1	0				
María Laura (N)						1	1	100				
Pavía Moscatel						1	9	0	2	10	70 (40-100)	
Nemaguard						1	1	0				
Ginart (Barceló)						1	7	100				
Fantasia (N)									3	15	45 (0-100)	
Dixiland									2	10	50 (0-100)	
Elegant Lady									3	15	47 (20-80)	

*El análisis sanitario fue realizado con muestras compuestas formadas con cinco plantas cada una. Por tanto, los números entre paréntesis son porcentaje mínimo y máximo de infección con PNRSV.

De acuerdo a Mink *et al.* (1987), existen por lo menos tres serogrupos de PNRSV (CH3, 9 y 30), siendo el CH 9 el más común. En teoría, los antisueros comerciales utilizados cubren todos los grupos pero es importante hacer esta precisión.

4) Métodos moleculares.

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares para la detección y caracterización de PNRSV, tales como RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa), IC-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura), los cuales prometen mayor precisión y abren nuevos horizontes para conocer a este virus (Rowhani *et al.*, 1995; Rowhani *et al.*, 1998; Spiegel *et al.*, 1996, MacKenzie *et al.*, 1997; Rosner *et al.*, 1997).

Al respecto, Hammond y Crosslin (1998) identificaron algunas sustituciones de nucleótidos que se correlacionan con sero- y patotipos conocidos.

IV.3 VIRUS DEL ENANISMO DE LOS *Prunus* (*Prune dwarf virus*, PDV)

Al igual que PNRSV, PDV se asocia a numerosas enfermedades con diferentes síntomas dependiendo de los huéspedes y de la región. Si bien sus efectos en cerezo son conocidos desde 1768 en Francia, recién fue formalmente descrito en 1936 en ciruelo, de ahí el nombre de *Prune dwarf virus* (virus del enanismo del ciruelo), comprobándose su transmisión por injerto.

Fue junto a PNRSV, de los primeros virus de frutales en ser inoculado mecánicamente (1948) y en 1963 se comprobó su transmisión natural.

Este virus está universalmente distribuido en cerezas y otros frutales de carozo siendo común la infección natural en duraznero, aunque es raro en ciruelos.

En Uruguay ya aparece en la lista de enfermedades de Koch de Brotos *et al.* (1981) siendo su presencia confirmada mediante detección serológica y por transmisión a indicadoras herbáceas y leñosas en 1993 (Maeso, 1994).

IV.3.1 Agente causal

PDV es un virus poliédrico de aproximadamente 19-22 nm de diámetro, perteneciente al grupo Iilar al igual que PNRSV.

IV.3.2 Síntomas

Los síntomas observados a campo generalmente son resultado de infecciones mezcladas con PNRSV. A pesar que los daños son importantes principalmente cuando se registran infecciones mixtas con PNRSV, PDV por sí sólo puede causar enfermedades de importancia como el enanismo del duraznero y la gomosis del damasco (Uyemoto *et al.*, 1989).

Al comienzo, los síntomas son muy similares a los descritos para PNRSV, presentando también fase severa y crónica. En la fase severa aparecen moteados o anillos cloróticos en las hojas que luego se necrosan cayendo el tejido afectado (cribado). Luego de la caída de los pétalos se produce el amarillamiento y caída de las hojas. Así es que la planta conserva hojas solamente en los ápices de los brotes. Esos síntomas sólo se dan al comienzo de la infección de una planta dando paso luego a la fase crónica, en la que se producen solamente moteado, anillos y cribado en las hojas. Los daños son importantes cuando la temperatura es baja en primavera.

Los árboles de duraznero afectados con «enanismo» presentan reducción de los entrenudos, son achaparrados, producen muchas yemas de madera y de flor, pero poco follaje; sus hojas son más chicas, erectas y de color verde más oscuro y los frutos más pequeños. Los síntomas pueden producirse año a año dependiendo de las condiciones ambientales (Uyemoto and Scott, 1992). En árboles viejos se puede producir muerte de yemas y de ápices de ramas.

En la primavera siguiente a la inoculación, al inicio de la temporada aparecen dibujos y moteados cloróticos en las hojas. En viveros, los plantines infectados son más pequeños y de color verde más oscuro, recuperándose hacia el fin de la estación.

En Uruguay, concretamente en el campo experimental de INIA LB, PDV fue detectado en infecciones mixtas con PNRSV en árboles de los durazneros 'O'Henry' y 'Fayette', los cuales presentaron la evolución descrita en el párrafo anterior (Figura 9).



Figura 9. A-C: Parcelas experimentales de las variedades 'Fayette' y 'O'Henry' en las cuales se detectó infección mixta de PNRSV y PDV D: Síntomas en cerezo (Caserta, Italia, 1994).

En ciruelos afectados por PDV, las hojas son más angostas, rugosas, engrosadas y duras, presentando a veces manchas cloróticas. El crecimiento al principio de la temporada es arrosado (entrenudos cortos) pero luego se vuelve normal, desapareciendo los síntomas en verano.

IV.3.3 Transmisión

El mecanismo principal de transmisión de PDV es por injerto al utilizar materiales infectados. También es capaz de transmitirse por semilla fundamentalmente en cerezos (20-70 % de transmisión (Gilmer and Way, 1960, Gilmer and Kamalsky, 1962), *Prunus mahaleb* (Cation, 1949, George and Davidson, 1963) y damasco (Fridlund, 1966) y por polen. La transmisión por polen es muy importante en cerezo ácido (*Prunus cerasus*).

También es capaz de transmitirse por polen en duraznero (Hutchins *et al.*, 1951), lo cual no ocurre en ciruelo. En la transmisión por polen, los árboles infectados al principio se encuentran cerca de árbol enfermo y en la dirección del viento dominante. El polen es capaz de infectar a un árbol sano incluso a través de la herida en el tronco generada por un corte para injertar.

En los trabajos llevados a cabo en INIA LB no se encontraron indicios de transmisión por semilla en Uruguay. Tanto en los análisis efectuados en el período 1992-97, como en los posteriores (2005), PDV no fue detectado en plantines de viveros comerciales sin injertar, lo cual seguramente está relacionado a que tampoco se lo detectó en las plantas proveedoras de semilla del portainjerto 'Pavía Moscatel'.

Sin embargo, se sospecha su transmisión planta a planta en condiciones de campo. En el experimento de seguimiento de la detección de virus en dos bloques de cultivares en el campo experimental de INIA LB (descrito para PNRSV) hubo un aumento del número de plantas infectadas con PDV (Cuadro 12). Ese incremento fue muy inferior al observado con PNRSV, sin embargo, dado el mayor daño potencial de PDV, su transmisión sería un factor a considerar.

Una suposición que se puede hacer en base a lo sugerido por la bibliografía es que, dado que este virus realmente afecta la viabilidad de los embriones y la vida de la planta, la mortalidad producida, probablemente limite su transmisión a la progenie.

IV.3.4 Detección

PDV puede ser detectado de forma muy similar a PNRSV. También produce necrosis de corteza y gomosis en el cerezo Shirofugen y síntomas en numerosos frutales de carozo, e indicadores herbáceos (*Momordica balsamica*, *Cyamopsiis tetragonaloba* y *C. maxima* cv. 'Butternut' permiten separarlo de PNRSV) (Figura 10).



Figura 10. Síntomas de PDV en plantines de *Cucurbita maxima* cv. 'Butternut'. Foto: H. Tanaka.

Cuadro 12. Evolución de la infección con PDV en dos grupos de plantas de duraznero en el campo experimental de INIA LB. Período 1995-1997. (Las plantas son las mismas que las consideradas en el Cuadro 5).

AÑO	Plantas de cultivares comerciales.		Plantas de cultivares comerciales.	
	Grupo 1 (32 árboles)		Grupo 2 (67 árboles)	
1995	1	3	18	27
1996	1	3	22	33
1997	1	3	26	39

También se detecta fácilmente por la prueba ELISA y, al igual que ocurre con PNRSV, recientemente se han desarrollado métodos moleculares para su detección y estudio.

En INIA LB se le ha detectado principalmente en algunos materiales y su frecuencia es mucho menor a la observada para PNRSV (Cuadro 13).

Cuadro 13. Detección de PDV por prueba de ELISA en diferentes cultivares de duraznero, nectarina (N) y ciruelo (C) en el período 1992-2005.

r Cultivar	1993			2001			2005		
	Nº de muestras	Porcentaje de detección	Nº de predios	Nº de muestras	Porcentaje de detección	Nº de predios	Nº de muestras	Porcentaje de detección	Nº de predios
EarlGrande	3	0	1	3	0	1	5	0	1
Rey del Monte	3	0				3	15	0	
Junegold	3	0	1	3	0	3	15	0	
Pavía Manteca									
Springcrest	3	0							
Summerset	3	0							
Flavorcrest	3	0				3	15	0	
Fayette	3	100							
O'Henry	3	100	1	3	100				
Flordaking	3	0							
Forastero	3	0	2	2	0				
Golden Japan (C)	3	0							
Vilha Nova			1	1	0				
Opedepe			1	6	0				
Rubysweet (C)			1	1	0				
Scarlet Pearl			1	1	100				
SunWright (N)			1	1	0				
Tropic Snow			1	1	0				
María Laura (N)			1	1	100				
Pavía Moscatel			1	9	0	2	10	0	
Nemaguard			1	1	0				
Ginart (Barceló)			1	7	0				
Fantasia (N)					0	3	15	0	
Dixiland						2	10	0	
Elegant Lady						3	15	0	

IV.4 VIRUS DE LA MANCHA CLORÓTICA FOLIAR (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)

Este virus, muy común en frutales de pepita, fue determinado hacia los años 60 en Europa y EE.UU. en frutales de carozo produciendo algunos síntomas muy particulares.

Se piensa que actualmente pueda estar distribuido en todo el mundo.

Aunque aún no se lo ha determinado claramente en nuestro país en frutales de carozo, su presencia ha sido comprobada infectando algunos materiales de manzano (Maeso, 1997d).

IV.4.1 Agente causal

Apple chlorotic leaf spot virus es un virus elongado perteneciente al género *Trichovirus*. Posee partículas filamentosas, generalmente flexuosas, con un largo de 720-740 nm y 12 nm de ancho (Brunt *et al.*, 1996).

Los aislamientos estudiados molecularmente han demostrado una divergencia genética elevada con una homología de nucleótidos en todo el genoma de entre 76-82% (Giunchedi, 2003), lo cual justificaría la gran variación de respuestas observada en huéspedes (Marenaud, Dunez y Bernhard, 1976).

IV.4.2 Síntomas

La mayoría de las especies y cultivares de cultivos frutícolas son poco afectadas por las variantes comunes de ACLSV, no observándose generalmente daños visibles en frutales de carozo (Desvignes, 1999).

Sin embargo, se citan algunos casos especiales asociados con aislamientos especialmente virulentos. Entre ellos se mencionan:

- «la falsa sharka del ciruelo» («plum pseudopox») donde se observan deformaciones de frutos similares a los de sharka (*Plum pox virus*, PPV). Estas deformaciones también se observan en cerezos (Figura 11 A y B).
- «el rajado de corteza en ciruelo» («plum bark split») el cual comienza con la formación de áreas marrón-rojizas en las ramas que luego se hunden, oscurecen y rajan, produciendo canchales con abultamientos necrosados en sus bordes que pueden progresar internamente y matar la rama (Figura 11 C).
- «dibujos en hojas de ciruelo» («plum line pattern») muy similar al ocasionado por *Ilarvirus*. Estas variantes están relacionadas con aquellas que producen el anillo herrumbroso en manzano («apple russet ring») y a veces provocan síntomas foliares en duraznero (en pocas hojas se observan moteados con bandas verdes más oscuras, que luego desaparecen).

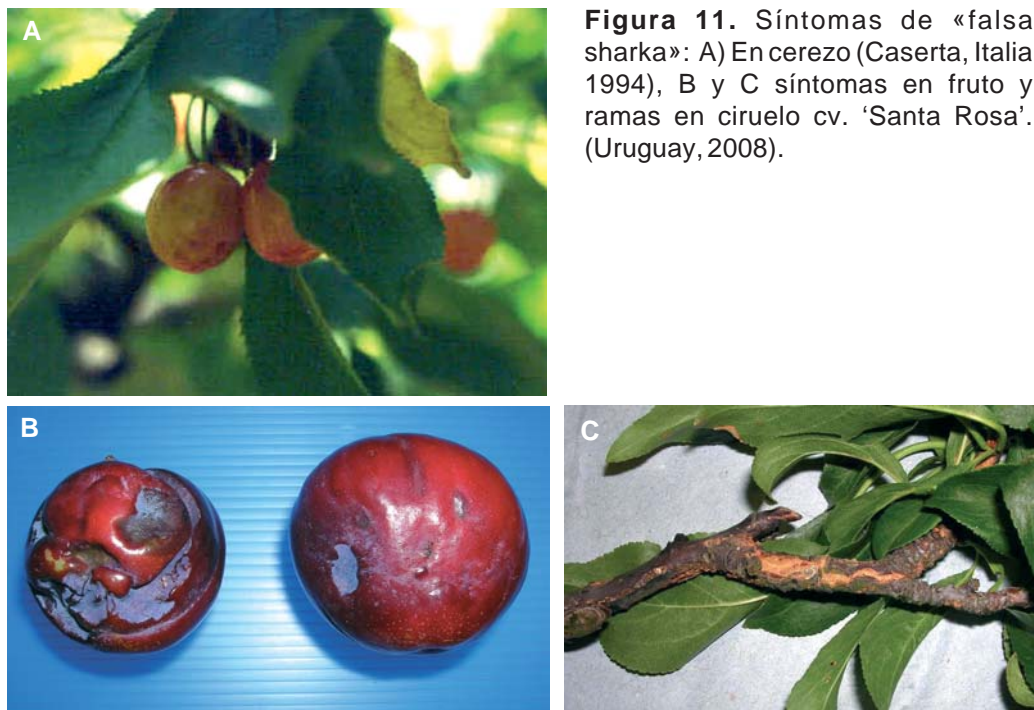


Figura 11. Síntomas de «falsa sharka»: A) En cerezo (Caserta, Italia 1994), B y C síntomas en fruto y ramas en ciruelo cv. 'Santa Rosa'. (Uruguay, 2008).

Sin contar los anteriores casos extremos, que son debidos a razas específicas de este virus, la mayor parte de las infecciones son latentes no teniendo un mayor efecto económico para frutales de carozo. Su efecto es el de complicar el análisis de otros virus o por mostrar efectos sinérgicos con ellos.

IV.4.3 Detección

IV.4.3.1 Injerto en indicadoras leñosas

Para frutales de carozo se recomienda el injerto en plantines del cultivar 'GF 305' en el cual se observa un moteado verde oscuro hundido. En nuestras condiciones no se ha ajustado esa prueba para frutales de carozo.

En Uruguay se ha observado claros resultados en la detección de este virus por indicadoras leñosas en manzano usando la técnica de doble injerto sobre plantines de semilla con los indicadores 'Virginia crab' clon R 12740-7A (*Malus pumila*) y *Malus platycarpa* (Figura 12).

IV.4.3.2 Inoculación mecánica a plantas herbáceas

El huésped recomendado es *Chenopodium quinoa*, el cual luego de la inoculación desarrolla lesiones locales cloróticas que luego se vuelven necróticas, formando anillos y dibujos cloróticos y necrosis (Figura 13).

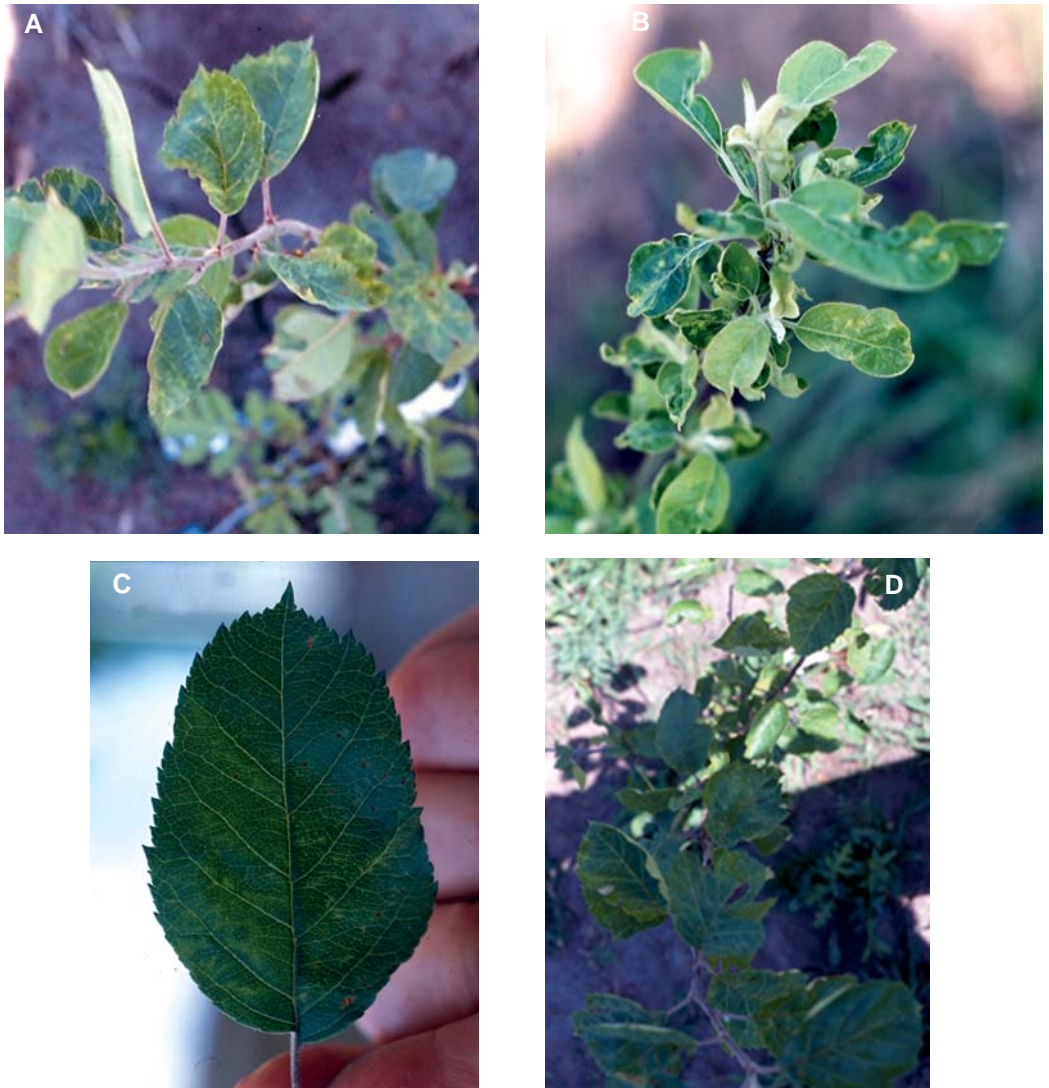


Figura 12. Síntomas en indicadores leñosas (*Malus* spp.) inoculadas con materiales de manzano infectados con ACLSV. INIA LB.



Figura 13. Síntomas en *Chenopodium quinoa*, inoculado con tejidos de manzano infectados con ACLSV.

IV.4.3.3 Serología

La detección no es tan precisa como con los virus anteriores.

Por un lado existen diferencias entre los reactivos disponibles y la capacidad para detectar aislamientos diferentes; por otro lado de la experiencia obtenida en INIA, solamente puede ser detectado en un período de tiempo muy corto, y para ello, el mejor tejido son los pétalos. Por lo tanto, esta técnica por el momento debe ser considerada un complemento a otros análisis.

IV.5 VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL DURAZNERO (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd)

Esta enfermedad fue descrita en Francia en la década de los 70, como consecuencia del análisis sanitario de materiales de duraznero para propagación (Desvignes y Savio, 1975).

Actualmente se encuentra presente en la mayor parte de las áreas del mundo donde se cultiva duraznero, sobre todo en las que predominan las variedades de origen estadounidense o japonés (Flores, 2000, Hadidi, *et al.*, 1997).

El agente causal es el viroide *Peach latent mosaic viroid* (género *Pelamoviroid*, familia *Avsunviroidae*) (Flores *et al.*, 1990).

Si bien se piensa que afecta únicamente al duraznero y sus híbridos (Desvignes 1983), algunos estudios lo reportan en ciruelo, damasco y cerezo entre otras especies de *Prunus* (Faggioli, Loreti y Barba, 1997; Hadidi *et al.*, 1997).

La enfermedad recibe el nombre de «mosaico latente» porque en la mayoría de las infecciones en condiciones de campo no se presentan síntomas y, en caso de presentarlos, éstos no se manifiestan inmediatamente (Flores, 2000). Esto se debe a la predominancia de cepas débiles que protegen de la infección de otras más nocivas (Llácer, 1998).

La enfermedad es generalmente benigna en árboles de hasta cinco a seis años y luego el decaimiento es variable, dependiendo del cultivar y las condiciones agronómicas y climáticas (Desvignes, 1999).

Los principales perjuicios causados en durazneros son (Desvignes, 1980):

- 1) Retraso de cuatro a seis días en la brotación, vegetación y maduración de frutos.
- 2) Estrías rosadas en los pétalos rosáceos.
- 3) Mosaico foliar (moteado, parches o «calico»).
- 4) Muerte de yemas provocando defoliación y pobre renovación de brotes.

- 5) Frutos aplastados con rajaduras corchosas en las suturas, con problemas de coloración, olor y sabor, y carozos con tendencia a partirse.
- 6) Acanaladuras en madera sin consecuencias para la corteza, asociadas con enrollado y curvado de hojas.
- 7) Problemas en lignificación que conducen a que el árbol presente un hábito abierto y envejecza prematuramente a partir del quinto año.
- 8) Mayor sensibilidad a otras enfermedades y stress climático, y finalmente.
- 9) Muerte prematura.

En la Figura 14 se muestran algunos síntomas asociados con la infección por PLMVd observados en Uruguay.

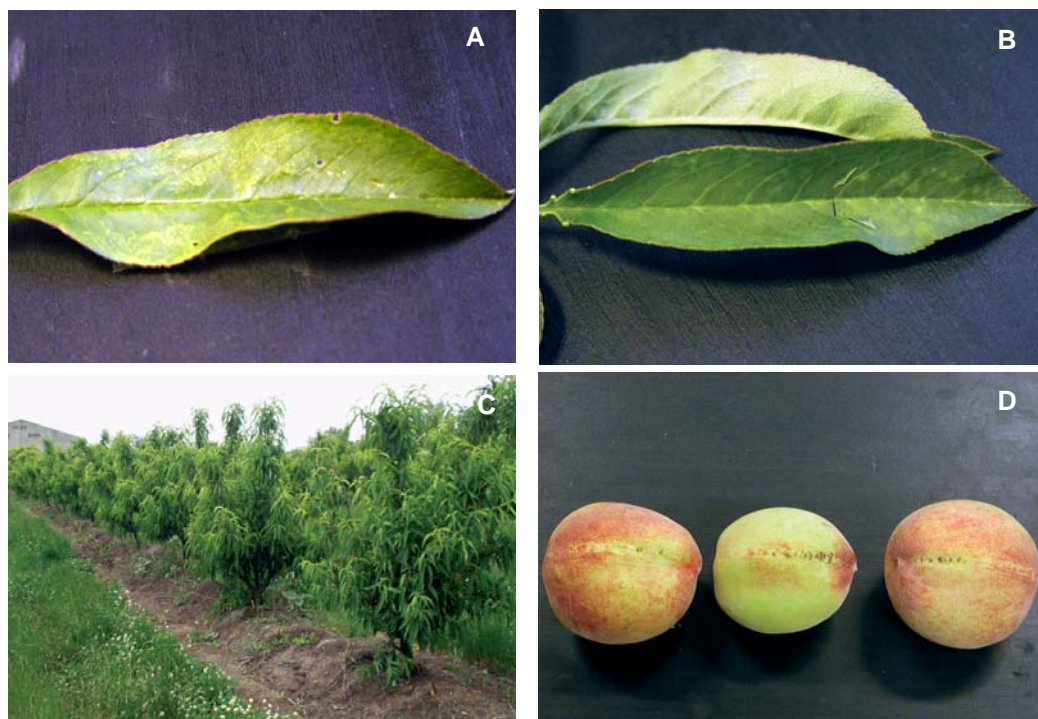


Figura 14. Síntomas asociados con infecciones de PLMVd en duraznero cv. 'Ginart' ('Barceló') en Uruguay. A,B: Dibujos cloróticos en hoja. C: Hábito abierto de planta con pérdida de vigor y D: Rajaduras en sutura de frutos.

IV.5.1 Transmisión

PLMVd se transmite por el uso de material de propagación infectado, por pulgones (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii* y *A. spiraecola*, en forma no persistente) (Flores *et al.*, 1992) y por herramientas contaminadas (Hadidi *et al.*, 1997). Las semillas y sus componentes no son afectadas y no se ha comprobado la transmisión por polen o ácaros.

La distribución del viroide dentro del huésped es variable. Según Desvignes (1981) luego de la infección inicial, para que un árbol esté totalmente infectado (sistémicamente) se necesitan tres a cuatro años. Llácer (1998) ha estimado que la transmisión dentro de un monte determinado puede alcanzar un 5% anual.

IV.5.2 Detección

Para la detección de PLMVd se pueden usar métodos biológicos (injerto en invernadero sobre plantines de duraznero cv. 'GF 305') o moleculares.

El indexaje sobre 'GF 305' se hace con la inoculación posterior con cepas agresivas, las cuales, si la muestra estaba infectada con cepas latentes, no manifiestan síntomas (Desvignes, J.C. 1999).

La detección por vía molecular se puede hacer con hibridación con sondas de ADN (Ambrós, S. *et al.* 1995) o mediante PCR (Shamloul *et al.*, 1995, Osaki *et al.*, 1999).

En INIA LB se ha detectado la presencia de PLMVd con la cooperación del Dr. V. Pallás (Universidad Politécnica de Valencia) mediante el uso de sondas de ácido nucleico (Figura 15). En el relevamiento inicial realizado en 2001 se lo determinó en nueve muestras pertenecientes a tres cultivares del campo experimental de INIA Las Brujas y de un productor dentro de un total de 49 muestras de 19 cultivares de duraznero y nectarina (Cuadro 14. Herranz, Maeso y Soria, 2002).

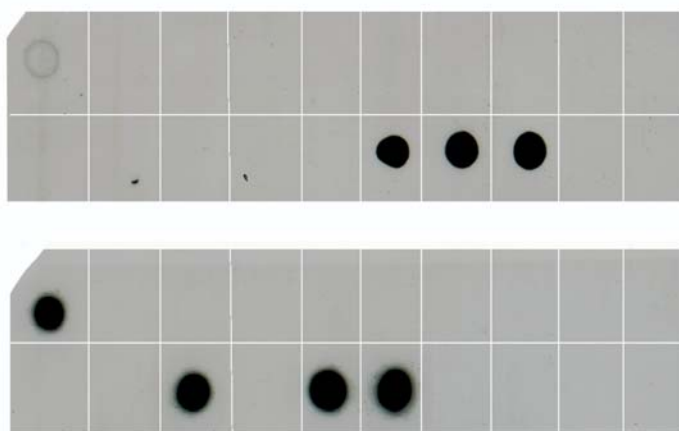


Figura 15. Detección de PLMVd en muestras de duraznero utilizando sondas ADN. INIA LB. 2001.

Cuadro 14. Detalle de las muestras analizadas en 2001 para relevamiento de PLMVd usando sondas de ADN y patógenos detectados¹ (Herranz, M.C.; Maeso, D.C. y Soria, J. 2002).

Cultivar	Lugar	No. de muestras	Desorden	Diagnóstico ¹
Duraznero				
Forastero	INIA LB 1	1	Sin síntomas	Sin detección
Vilha Nova	INIA LB 1	1	Sin síntomas	PNRSV
EarliGrande	INIA LB 1	1	Sin síntomas	PNRSV
EarliGrande	INIA LB 3	2	Mosaico severo, cribado	PNRSV, PLMVd
Opedepe	INIA LB 2	5	Cribado	Sin detección
Opedepe	INIA LB 3	1	Sin síntomas	Sin detección
Scarlet Pearl	INIA LB 3	1	Mosaico-moteado	PNRSV, PDV, PLMVd
Tropic Snow	INIA LB 3	2	Enrojecimiento y clorosis	Sin detección
Pavía Moscatel	Vivero Productor 1	3	"Quimera"- "mutación"	Sin detección
Pavía Moscatel	Vivero Productor 1	6	Sin síntomas	Sin detección
Nemaguard	Vivero Productor 1	1	Mosaico débil	Sin detección
Junegold	Productor 1	1	Albinismo localizado	PNRSV
Junegold	Productor 1	1	Plegado de hojas	Sin detección
Junegold	Productor 1	1	Declinamiento	PNRSV
Ginart (Barceló)	Productor 2	7	Mosaico-variegado anillos cloróticos	PNRSV, PLMVd
Forastero	Productor 2	1	Defoliación y anillos cloróticos	Sin detección
O' Henry	Productor 2	3	Severa pérdida de vigor	PNRSV, PDV
Nectarina				
SunWright	INIA LB 3	1	Cribado, clorosis	Sin detección
María Laura	INIA LB 3	1	Enrollamiento foliar	PNRSV, PDV
Damasco				
Bulida	INIA LB 1	1	Sin síntomas	PNRSV
Royal	INIA LB 1	1	Clorosis de nervaduras	PNRSV
Plantines OP	INIA LB 2	2	Cribado foliar	Sin detección
Piet Cilliers	INIA LB 1	1	Sin síntomas	PNRSV
Ciruelo				
Golden Japan	INIA LB 2	2	Mosaico	PNRSV
Rubysweet	INIA LB 3	1	Cribado	Sin detección

¹Se analizaron los siguientes patógenos: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *American line pattern virus* (ALPV), *Plum pox virus* «sharka» (PPV) y *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV).

En la temporada 2003-04 se amplió el relevamiento y se hizo un seguimiento de 71 plantas de nueve cultivares en seis predios con la finalidad de confirmar la detección, observar la distribución del problema en el área frutícola sur y evaluar los síntomas asociados durante el ciclo.

La detección en laboratorio de las muestras fue llevada a cabo por M. Federici de la Unidad de Biotecnología de INIA y en el laboratorio del Dr. Pallás, mostrándose los resultados en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Detección de PLMVd en cultivares de duraznero en la zona sur de Uruguay y síntomas observados.

Cultivar	Lugar	No. de muestras	Síntomas	Detección de PLMVd
Scarlet Pearl	INIA LB	1	Sin síntomas	+
Opedepe	INIA LB	1	Sin síntomas	-
Flavorcrest	Canelón Chico 1	5	Sin síntomas	-
	Melilla 1	5	Sin síntomas	-
Elegant Lady	INIA LB	1	Estrías en pétalos	+
	Canelón Chico 1	5	Sin síntomas	-
	Melilla 1	5	Estrías en pétalos	-
EarliGrande	INIA LB	1	Sin síntomas	+
	Canelón Chico 1	5	Enrojecimiento foliar, moteado, estrías en pétalos	1/5 +
	Melilla 2	5	Deformación foliar	+
	Melilla 3	5	Deformación foliar, aclarado de nervaduras	+
Ginart (Barceló)	INIA LB	3	Estrías en pétalos, moteado de hojas, rajaduras en sutura de fruto	+
	Melilla 2	5	Estrías en pétalos, moteado de hojas, rajaduras en sutura de fruto	+
	Canelón Chico 2	5	Estrías en pétalos, moteado de hojas, rajaduras en sutura de fruto. Planta de hábito más abierto, pérdida de vigor	+
	Melilla 3	5	Aclarado de pétalos, de nervaduras, acucharado de hojas, rajaduras en sutura de fruto. Planta de hábito más abierto, pérdida de vigor	+
O´Henry	Melilla 3	5	Aclarado de pétalos, de nervaduras, acucharado de hojas. Pérdida de vigor y muerte.	+
Pavía Canario	Melilla 3	3	Sin síntomas	+
Rey del Monte	INIA LB	1	Sin síntomas	-
	Melilla 1	5	Sin síntomas	-

Al igual que con otras enfermedades, existen cultivares en los cuales se detectó PLMVd en todas las muestras analizadas. Tal es el caso de los durazneros ‘Ginart’ (‘Barceló’) y ‘EarliGrande’. En el primero de ellos, a su vez se observaron los síntomas más severos como ser pérdida de vigor del árbol, tendencia a presentar un hábito de crecimiento «abierto», y rajaduras en la sutura de los frutos (Figura 14).

En lo referente a la detección molecular, se han logrado avances en la generación de reactivos nacionales y de ajuste de la metodología, continuándose trabajos en el tema, tanto en INIA como en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía (Federici y Pagliano, com. pers.) los cuales, además del avance científico, contribuirán con el control de la sanidad de los materiales propagativos nacionales.

IV.6 MÉTODOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE FRUTALES DE HOJA CADUCA TRANSMISIBLES POR INJERTO

Como se ha visto en las secciones anteriores, en Uruguay se ha demostrado la presencia de algunas de las virosis y enfermedades afines de estos cultivos, por lo que una de las primeras medidas a tomar es la prevención del ingreso de aquellos problemas que existen en la región pero que no han llegado a nuestros montes. Al respecto, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) posee listas de agentes cuarentenarios y requerimientos para el ingreso de materiales de propagación. Por lo tanto, es de fundamental importancia respetar esos requisitos y bajo ningún concepto introducir materiales sin el debido control. Si bien esto enlentece el acceso a novedades a nivel de un productor particular, evita problemas futuros, muchas veces de difícil solución.

Concretamente, en frutales de carozo se deberá tener especial cuidado de no introducir «Sharka», enfermedad muy importante que por muchos años estuvo restringida a Europa y actualmente ha viajado a numerosos países, entre ellos, Argentina (Dal Zotto, 2006).

El control del resto de las enfermedades existentes deberá empezar en los viveros con la producción de materiales con sanidad comprobada. Para ello una primer etapa es la identificación y empleo de plantas madres productoras de semillas de portainjerto y de yemas sin PNRSV, ACLSV, PDV y PLMVd.

En INIA LB se comenzó a formar en 1997 un pequeño bloque de reserva de cultivares bajo malla el cual es analizado serológicamente anualmente y aún conserva su estado sanitario (Figura 16). Se tiene conocimiento de su importancia desde el punto de vista de INIA, pero ello no es suficiente a nivel nacional. A partir del trabajo de la Comisión Asesora a la DGSSAA en frutales de hoja caduca y que fue integrada por representantes de los sectores productivos, viveristas e instituciones públicas, fueron aprobadas en 2005 las normas de certificación de plantas (disponibles en www.inase.org.uy) y así el INASE, DGSSAA, el INIA y los viveristas han comenzado esfuerzos para tener una colección de cultivares para propagación analizados sanitariamente. La tarea no es fácil y aún existen interrogantes tecnológicos por resolver pero se está en camino.

Colaborando con ese esfuerzo se desarrolló por parte de ANVU (Agrupación Nacional de Viveristas del Uruguay) un proyecto FPTA (Fondo para la Promoción de la Tecnología Agropecuaria de INIA). En él se hizo un relevamiento sanitario de plantas proveedoras de yemas y de semillas disponibles para los viveros de forma de determinar individuos sin detección de PNRSV, PDV y PPV. PPV es el virus causante de la «sharka», el cual a pesar de no haber sido encontrado en Uruguay se consideró importante confirmar su ausencia en estos materiales (Campi, Fontán y Maeso, com. pers.). Esos materiales servirán para que ANVU e INASE formen sus materiales básicos y que éstos



Figura 16. Bloque de reserva bajo malla con algunos cultivares de duraznero analizados serológicamente. INIA LB.

reúnan las condiciones requeridas en los estándares redactados (disponibles en www.inase.org.uy).

Teóricamente, para que las plantas proveedoras de yemas mantengan su condición sanitaria simplemente se deberá evitar que florezcan, mientras que las plantas productoras de semilla de portainjertos deberán ser analizadas anualmente y contar con cierto aislamiento a fuentes de virus. De la experiencia en el seguimiento de los materiales candidatos durante ese proyecto FPTA queda una duda frente a este manejo: las fuentes de error presentes en una tarea tan importante como lo es establecer un monte dador de yemas a largo plazo en un lugar fijo en condiciones de campo. Esas fuentes de error (plantas en las que en análisis previos no se detectaron virus, sobre todo PNRSV, y posteriormente sí) pueden ser derivadas de limitantes en el análisis en sí o de infecciones posteriores a la detección. Por lo tanto, se debe estar alerta en los pasos a dar, por lo menos en estas primeras etapas de ajuste.

Si bien solamente se cuenta con datos nacionales preliminares sobre los daños ocasionados por estas enfermedades, la ventaja de su control a nivel de vivero traerá seguramente beneficios no sólo a éstos (mayores prendimientos y mejor calidad de planta) sino en el monte establecido, ya que cuanto más tarde sea la infección en la vida de la planta, menores serán sus daños, y, como se expresó, al aumentar la proporción de plantas sanas se disminuirán las probabilidades de infección natural, tal como se ha reportado en California por Uyemoto *et al.* (1993).

IV.7 BIBLIOGRAFÍA

- AMARI, K.; SANCHEZ-PINA, M. A. and PALLAS, V.** 2004. Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus* by gametes in apricot. *Acta Horticulturae* 657:109-113.
- AMBRÓS, S. et al.** 1995. Peach latent mosaic and pear blister canker viroids: detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees. *Acta Horticulturae* 386:515-521.
- BERNHARD, R.; SAUNIER, R. et MARENAUD, C.** 1975. Evolution et performance d'un clone sanitaire de pêcher issu de thérapie après huit années d'observation. *Acta Horticulturae*, 44: 69-79.
- BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L. and ZURCHER, E.J.** (eds.) (1996 onwards). *Apple chlorotic leaf spot trichovirus*. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL .
- CAÑIZARES, M.C.; MARCOS, J.F. and PALLÁS, V.** 1998. Studies on the incidence of *Hop Stunt Viroid* in apricot tree by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. Proc. 17th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases. *Acta Horticulturae* 472: 581-586.
- DAL ZOTTO, A.** 2006. First Report in Argentina of *Plum pox virus* causing Sharka Disease in *Prunus*. *Plant Disease* 90: 523.
- DESVIGNES, J.C.** 1980. Different symptoms of the *peach latent mosaic*. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 15: 371-374.
- DESVIGNES, J.C.** 1981. Epidemiologie de la mosaïque latente du pêcher (PLMV). 1^{er} Colloque Recher. Fruit. Bordeaux: 263-276.
- DESVIGNES, J.C.** 1983. Resistance of some *Prunus* species to the peach latent mosaic virus disease (PLMV). *Acta Horticulturae* 193:51-57.
- DESVIGNES, J.C.** 1999. Virus diseases of fruit trees. CTIFL. Paris. 202 p.
- DESVIGNES, J.C. et SAVIO, A.** 1975. Mise en évidence d'une virose provoquant la déformation des noyaux du semis de pêcher GF 305. *Acta Horticulturae* 44:113-117.
- EHLERS, C.G. and MOORE, J.D.** 1957. Mechanical transmission of certain stone fruit viruses from *Prunus* pollen (Abstr.). *Phytopathology* 47:519-520.
- FAGGIOLI, F.; LORETI, S. y BARBA, M.** 1997. Occurrence of *peach latent mosaic viroid* (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease* 81:423.
- FLORES, R.** 2000. Viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd). En: Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Ediciones Mundi-Prensa. p 21-22.
- FLORES, R. et al.** 1990. Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease. *Res. Virology* 141:109-118.
- FLORES, R. et al.** 1992. Studies on the detection, transmission, and distribution of *peach latent mosaic viroid* in peach trees. *Acta Horticulturae* 309: 325-330.
- FRIDLUND, P.R.** 1966. Transmission and lack of transmission of seven viruses through *Prunus* seed. *Plant Disease Reporter* 50:902-904.
- FULTON, R.W.** 1970. *Prunus necrotic ringspot virus*. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Virus N° 5.

- GEORGE, J.A. and DAVIDSON, T.R.** 1963. Pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses from tree to tree. *Canadian Journal of Plant Science* 43:276-288.
- GILMER, R. M. and WAY, R.D.** 1960. Pollen transmission of necrotic ringspot and prune dwarf viruses in sour cherry. *Phytopathology* 50:624-625.
- GILMER R.M. and KAMALSKY, L.R.** 1962. The incidence of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses in commercial Mazzard and Mahaleb cherry root-stock. *Plant Disease Reporter* 46:583-585.
- GILMER, R.M.; DUAIN MOORE, J.; NYLAND, G.; WELSH, M.F. and PINE, T.S.** 1976. Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America. *Agriculture Handbook N° 437*. USDA. Washington. 433 p.
- GIUNCHEDI, L.** 2003. Malattie da virus, viroidi e fitoplasmi degli alberi da frutto. Ed. Edagricole. p. 280-301.
- GREBER, R.S.; KLOSE, M.J.; MILNE, J.R. and TEAKLE, D.S.** 1991. Transmission of *prunus necrotic ringspot virus* using plum pollen and thrips. *Annals of Applied Biology* 118 (3):589-593.
- HADIDI, A. et al.** 1997. Occurrence of *peach latent mosaic viroid* in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Disease* 81: 154-158.
- HAMMOND, R.W. and CROSSLIN, J.M.** 1998. Virulence and molecular polymorphism of *prunus necrotic ringspot virus* isolates. *J. Gen. Virol.* 79:1815-1823.
- HERRANZ, M.C.; MAESO, D.C. y SORIA, J.** 2002. First report of *Peach latent mosaic viroid* on peach in Uruguay. *Plant Disease* 86 (12):1405.
- HUTCHINS, L.M.; KINMAN, C.F.; COCHRAN, L.C. and STOUT, G.L.** 1951. Muir peach dwarf. In: «Virus diseases and other disorders with viruslike symptoms of stone fruits in North America». *USDA Handbook* 10:63-70.
- KOCH DE BROTONS, L. et al.** 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprofitos en el Uruguay. MGAP, DGSA, DSV. Informe técnico N° 9. 140 p.
- LLÁCER, G.** 1998. General aspects of Peach Latent Mosaic disease. *Proc. 17th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases. Acta Horticulturae* 472: 561-564.
- MAESO, D. et al.** 1994. Investigación en virus que afectan frutales de hoja caduca en Uruguay. III Simposio de Integración Hortícola. V Congreso Nacional de Horticultura. Junio 1994. Resúmenes de Trabajos Presentados.
- MAESO, D.** 1994. Enfermedades causadas por virus en frutales de carozo. In: «Resultados Experimentales en Frutales de Carozo». INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión Nro. 30: 34-37.
- MAESO, D. et al.** 1995. Studies on fruit tree viruses in Uruguay. *Acta Horticulturae* 386:155-164.
- MAESO, D.** 1995. Investigación en enfermedades causadas por virus y organismos afines en frutales de hoja caduca. In: «Resultados Experimentales en Protección Vegetal en Frutales». INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión Nro. 70: 24-39.
- MAESO, D.** 1997a. Transmisión por semilla de PNRSV (*Prunus Necrotic Ringspot Virus*) en el portainjerto 'Pavía Moscatel'. In: *Jornada de Resultados Experimentales en Protección Vegetal en Frutales*. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión Nro. 150: 24-29.

- MAESO, D.** 1997b. Seguimiento de la transmisión a campo de virus de duraznero. In: Jornada de Resultados Experimentales en Protección Vegetal en Frutales. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión Nro. 150: 30-32.
- MAESO, D.** 1997c. Evaluación de pérdidas por virus en frutales de carozo. In: Jornada de Resultados Experimentales en Protección Vegetal en Frutales. INIA Las Brujas. Serie de Actividades de Difusión Nro. 150: 33-37.
- MAESO, D.** 1997d. Virosis latentes del manzano en Uruguay. In: Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. p 167.
- MAESO, D. y CASTILLO, A.** 1997. Detección de virus en frutales de carozo con cerezos 'Shirofugen' (*Prunus serrulata*) cultivados *in vitro* en Uruguay. In: Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. p 164.
- MACKENZIE D.J.; MCLEAN M.A.; MUKERJIS. and GREEN, M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.
- MARENAUD, C.; DUNEZ, J. and BERNHARD, R.** 1976. Identification and comparison of different strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* and possibilities of cross protection. *Acta Horticulturae* 7: 219-226.
- MINK G.I.; HOWELL W.E.; COLE A. and REGEV S.** 1987. Three serotypes of *Prunus necrotic ringspot virus* isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry in Washington. *Plant Disease* 71: 91-93.
- OSAKI O.; YAMAGUCHI M. SATO Y. ; TOMITA Y.; KAWAI Y.; MIYAMOTO Y. and OHTSU Y.** 1999. *Peach Latent Mosaic Viroid* isolated from Stone Fruits in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 3- 8.
- PUSEY, P.L. and YADAVA, U.L.** 1991. Influence of *Prunus necrotic ringspot virus* on growth, productivity and longevity of peach trees. *Plant Disease* 75 (8): 847-851.
- ROSNER A.; MASLENIN L. and SPIEGEL S.** 1997. The use of short and long PCR products for improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in woody plants. *J. Virol. Methods.* 67: 135-141.
- ROWHANI A.; MANINGAS M.A.; LILE L.S.; DAUBERT S.D. and GOLINO D.A.** 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347-352
- ROWHANI A.; BIARDI L.; ROUTH G.; DAUBERT S.D. and GOLINO D.A.** 1998. Development of sensitive colorimetric-PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Disease* 82: 880-884.
- SHAMLOUL, A.M. et al.** 1995. *Peach latent mosaic viroid*: nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Horticulturae* 386: 522-530.
- SPIEGEL S.; SCOTT S.W.; BOWAN-VANCE V.; GALIAKPAROV N.N. and ROSNER A.** 1996. Improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 681-685.
- UYEMOTO, J.K.; LUHN, C.F.; ASAI, W.; BEEDE, R.; BEUTEL, J.A. and FENTON, R.** 1989. Incidence of ilarviruses in young peach trees in California. *Plant Disease* 73 (3): 217- 220.
- UYEMOTO, J.K.; ASAI, W.K. and LUHN, C.F.** 1992. Iilarviruses: evidence for rapid spread and effects on vegetative growth and fruit yields of peach trees. *Plant Disease* 76 (1): 71 -74.

- UYEMOTO, J.K.; BEEDE, R.H.; CONNELL, J.H.; VIVERO, M. and YOSHIKAWA, F.T.** 1993. Reduced incidence of ilarviruses in almond and peach in California. *Plant Disease* 77 (7): 756.
- UYEMOTO, J.K.; ROWHANI, A. and LUHN, C.F.** 1996. Mechanical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus* to young trees of Nemaguard peach and Nanking cherry. *Plant Disease* 80 (1): 104.
- VASKOVÁ, D.; KARESOVÁ, R.; PETRZIK, K. and SPAK, J.** 2001. Variability and molecular typing of the woody-tree infecting ilarviruses (*Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus*). Proc. of the 18th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases. Ed. M.F. Clark., *Acta Horticulturae* 550: 237-244.
- WAY, R.D. and GILMER, R.M.** 1958. Pollen transmission of necrotic ringspot virus in cherry. *Plant Disease Repr.* 42: 1222-1224.