ITEA (1998), Vol. **94V N.° 2,** 76-88

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL VIRUS DE LA SHARKA (Plum pox potyvirus) EN ALBARICOQUERO

P. Martínez-Gómez
F. Dicenta

Departamento de Mejora y Patología Vegetal
Centro de Edafología y Biología Aplicada
del Segura (CSIC)
Apartado 4195, 30080 Murcia
España

RESUMEN

El virus de la sharka (Plum pox potyvirus) es actualmente uno de los principales factores limitantes del cultivo del albaricoquero en las zonas afectadas por esta enfermedad. El control de esta virosis debe llevarse a cabo mediante métodos de tipo preventivo y de una forma definitiva mediante la obtención de plantas resistentes. En este trabajo se estudian las distintas etapas del método de determinación del nivel de resistencia a la sharka en albaricoquero: obtención del GF305, inoculación del GF305, injerta del albaricoquero y ciclos de crecimiento artificial. Los resultados muestran que la germinación de las semillas del GF305 debe de hacerse por estratificación a 7°C durante 14 semanas, o mediante eliminación del endocarpo y la testa en el caso de necesidad urgente de material (3 semanas). Las inoculaciones mecánica y por inyección no dieron resultados positivos, siendo la inoculación con corteza o yema de GF305 enfermo las más adecuadas. Para asegurar la inoculación, se propone la injerta del albaricoquero sobre un GF305 inoculado y mostrando fuertes síntomas de sharka. La mejor época para la injerta fue en Mayo (a yema viva), y como patrón, el Real Fino tuvo un mejor comportamiento que el GF305. Por último, el periodo artificial de reposo en la cámara a 7°C debe ser de 9 semanas para el GF305 y de 11 para el albaricoquero, mostrándose muy beneficioso en la aparición de síntomas en las plantas susceptibles.

Palabras clave: *Prunus armeniaca* L., Plum pox potyvirus, Programa de mejora, Evaluación de la resistencia, Melocotonero GF305.

SUMMARY

EVALUATION OF RESISTANCE TO SHARKA VIRUS (Plum pox potyvirus) IN APRICOT

Sharka (Plum pox potyvirus) is one of the limiting factors in apricot production in the affected areas. The virosis can be definitively controlled by developing resistant cultivars. In this paper we describe the most important steps involved in evaluating resistance to sharka: Germination and inoculation of GF305, apricot grafting and cold chamber treatment. The results show that seeds should be germinated by stratification at 7°C for 14 weeks or, if the material is needed urgently, by eliminating the shell and pellicle (after which the seeds germinate in 3 weeks). Neither mechanical nor inoculation by injection provide good results, and inoculation with a chip or a chip-bud of a

diseased GF305 was the most successful. Grafting of apricot onto an inoculated rootstock showing evident symptoms of sharka, is recommended. The best time for grafting seems to be May and Real Fino apricot gave better results than GF305. The artificially induced period of rest in a cold chamber at 7°C should last 9 weeks in the case of GF305 and 11 weeks in the case of apricot.

Key words: *Prunus armeniaca* L., Plum pox potyvirus, Breeding program, Resistance evaluation, GF305 peach.

Introducción

España es el segundo país productor mundial de albaricoque, concentrándose la producción en las Comunidades de Murcia y Valencia. Es precisamente en estas regiones donde, desde mediados de los años ochenta, se está produciendo una fuerte expansión del virus de la sharka (Plum pox potyvirus) (LLÁCER *et al.*, 1985), que supone uno de los mayores factores limitantes en la producción de este cultivo (DICENTA *et al.*, 1996). El control de esta enfermedad debe realizarse mediante métodos preventivos y de una manera definitiva mediante la obtención de variedades resistentes. Con este último objetivo, en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia, desde 1991 se lleva a cabo un programa de mejora para la resistencia a la sharka en albaricoquero (EGEA *et al.*, 1997).

Para la evaluación del nivel de resistencia de los materiales obtenidos en este programa de mejora se ha empleado un método basado en el descrito por AUDERGON y MORVAN (1990), con algunas modificaciones. En el método utilizado se procede en primer lugar a la inoculación del GF305 y posteriormente a la injerta del albaricoquero. En el presente trabajo se evalúa la eficiencia de las principales etapas de este método (multiplicación del GF305, inoculación del GF305, injerta del albaricoquero y los ciclos de crecimiento artificial) al objeto de optimizar su aplicación en los programas de mejora para resistencia a la sharka que se llevan a cabo en albaricoquero.

Material y métodos

Material vegetal

Para la evaluación de las descendencias se han utilizado como patrones susceptibles el melocotonero GF305 (conocido indicador leñoso de numerosas virosis) (BERNHARD *et al.*, 1969), y el albaricoquero Real Fino (patrón utilizado habitualmente en albaricoquero en Murcia). Las plantas que están siendo evaluadas son 1.414 descendientes de albaricoquero de 31 familias obtenidas en el programa de mejora del CEBAS de Murcia. De ellos, 144 descendientes se encuentran ya en su segundo ciclo de evaluación y el resto en el primer ciclo o en el ciclo 0 (ciclo de inoculación).

Como fuente del Plum pox potyvirus (PPV) se ha utilizado el aislado RB3.30 (tipo Dideron) procedente de la colección de aislados del IVIA de Valencia y obtenido a partir de ciruelo Red Beaut en España.

Multiplicación del GF305

La multiplicación del GF305 se realizó a partir de semillas. Para la germinación de

las semillas se empleó normalmente la estratificación a 7°C, introduciendo las semillas con el endocarpo, previamente tratadas con TMTD, en cajas de plástico perforadas, llenas de vermiculita húmeda.

Al objeto de acelerar el proceso también fueron ensayados dos métodos de germinación más rápida. En primer lugar se utilizó un tratamiento hormonal con Benzil Amino Purina (BAP) para romper el letargo de las semillas (ROUSCAS *et al.*, 1980). Este método básicamente consiste en la eliminación del endocarpo seguido de un tratamiento con una solución de BAP, y la posterior germinación en placas Petri con vermiculita húmeda a 25°C en condiciones estériles.

El segundo método de germinación rápida ensayado fue mediante eliminación del endocarpo y de la testa de la semilla, donde se localizan las sustancias inhibidoras de la germinación (MONET, 1983). Las semillas desnudas se entierran ligeramente con vermiculita húmeda en bandejas a temperatura ambiente.

En los tres métodos utilizados, se realizaron 4 repeticiones de 25 semillas cada una, observando el porcentaje de semillas germinadas a lo largo del tiempo.

Inoculación del melocotonero GF305

Cuando los GF305 presentaron un adecuado desarrollo, después de dos meses aproximadamente, se procedió a su inoculación. El método de inoculación utilizado normalmente fue el de injerto de yema o chapa (corteza) procedente de un GF305 enfermo. Al objeto de simplificar el proceso de inoculación hemos ensayado también otros dos métodos más sencillos y rápidos, descritos en la bibliografía.

En primer lugar se utilizó la inoculación mecánica con fuente de inóculo herbáceo (hojas de *Nicotiana benthamiana* enferma) y con fuente de inóculo leñoso (hojas de GF305 enfermo). Las muestras se trituran en tampón fosfato (PBS) y el triturado se aplica a la hoja a inocular utilizando el carborundum como abrasivo (MATERAZZI *et al.*, 1991).

El segundo método de inoculación ensayado fue el descrito por BOYÉ y DESVIGNES (1986) y DESVIGNES (1997), aplicando extractos de hojas enfermas (igualmente de *Nicotiana benthamiana* y de GF305) en tampón fosfato (PBS), en tallos de plantas jóvenes mediante una inyección.

Un total de 20 plantas de GF305 fueron utilizadas en cada uno de los cuatro tipos de inoculación, observándose el número de plantas con síntomas y ELISA positivo, antes y después del tratamiento en cámara fría.

Injerta del albaricoquero sobre GF305

Después de la inoculación de los GF305, cuando el tallo tenía un tamaño próximo a 0,5 centímetros de diámetro, se procedió a la injerta del albaricoquero. Hemos ensayado dos fechas distintas de injerta. En primer lugar en mayo a "yema viva" injertando 142 descendientes. Al año siguiente, al objeto de adelantar unos tres meses el proceso de evaluación fue ensayada una injerta en febrero a "yema dormida" injertando 98 descendientes. Este mismo año fue repetida la injerta en mayo injertando 703 descendientes. Se observó el número de yemas de albaricoquero brotadas en cada injerta.

También se realizó un ensayo para determinar la aptitud a la injerta del albaricoquero Real Fino y evaluar su posible utilización como patrón en los ensayos de re-



Figura 1. Vista panorámica del invernadero donde se llevaron a cabo los ensayos de resistencia a la sharka

Figure 1. General view of the greenhouse facilities for sharka resistance evaluation

sistencia. Para ello las variedades Búlida y Canino (como variedades más importantes en Murcia y Valencia), Currot (variedad muy precoz) y Pepito del Rubio (de gran calidad), fueron injertadas a "yema viva" sobre Real Fino y sobre GF305 con 15 repeticiones. Se observó el número de yemas brotadas en cada caso.

Ciclo de crecimiento artificial

Una vez obtenido el patrón GF305, inoculado e injertado con el albaricoquero, las plantas fueron mantenidas en el invernadero a prueba de insectos (figura 1) durante unos 2 o 3 meses (ciclo 0) realizándose una observación de síntomas en hoja. Para la inducción del letargo, las plantas se introdujeron en una cámara oscura a 7 °C y con una alta humedad relativa (figura 2). A la salida de la cámara fría se podaron las plantas y se realizaron dos observaciones de síntomas en hoja, la primera al mes de la salida del frío y la segunda a los dos meses. Tras esta segunda observación de síntomas fue aplicada la prueba ELISA-DASI con anticuerpos monoclonales 5B-IVIA (CAMBRA *et al.*, 1994), al objeto de verificar la presencia o ausencia del virus. La inducción de este reposo artificial en cámara fría nos permite obtener dos ciclos de estudio al año (figura 3).

El criterio de clasificación del nivel de resistencia utilizado fue básicamente el descrito por AUDERGON *et al.* (1994). Cuando el GF305 no manifestó síntomas se consi-

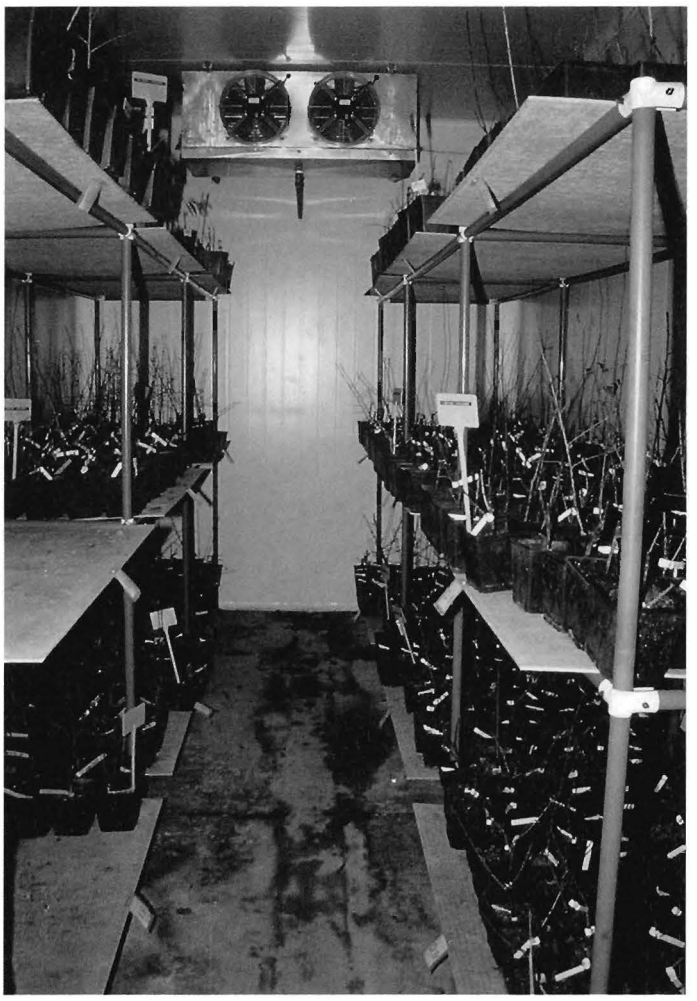


Figura 2. Interior de la cámara fría donde las plantas se sometieron al periodo de letargo artificial
Figure 2. Cold chamber where the plants were inducted to the artificial lethargy

deró que la inoculación había fallado y se procedió de nuevo a su inoculación. En el caso de presencia de síntomas en el GF305, se realizó también la observación de síntomas en el albaricoquero. Los albaricoqueros que mostraron síntomas de la enfermedad se consideraron susceptibles (figura 4). Posteriormente se llevó a cabo una prueba ELISA-DASI. Los materiales que dieron ELISA positivo pero no manifestaban síntomas, fueron considerados tolerantes. Por último, los materiales que no manifestaban síntomas y dieron ELISA negativo, se consideraron resistentes.

Al objeto de determinar el tiempo de permanencia óptimo de los materiales en la cámara fría, fueron ensayados diferentes

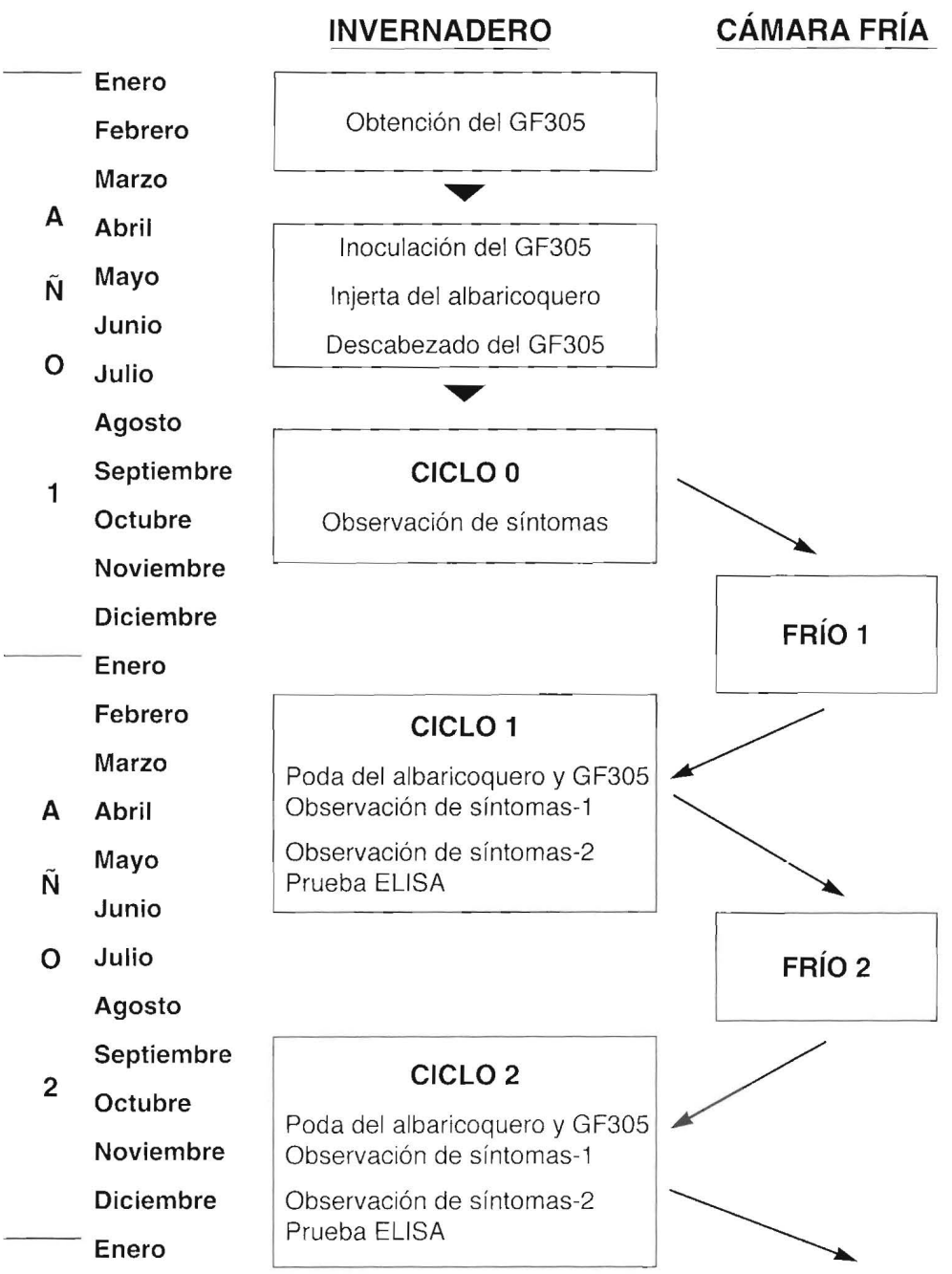


Figura 3. Calendario del método de determinación del nivel de resistencia del albaricoquero a la sharka

Figure 3. Schedule for evaluating apricot susceptibility to sharka



Figura 4. Descendiente de albaricoquero extremadamente sensible mostrando fuertes síntomas de sharka
Figure 4. Very susceptible apricot descendant showing strong sharka symptoms

períodos en torno al considerado óptimo: 11, 12 y 13 semanas para el albaricoquero, y 9 y 11 para el GF305. Se estudió la influencia del período de reposo artificial en la mortalidad de las plantas y en la aparición de síntomas, contabilizando el número de plantas con síntomas y ELISA positivo tras los tratamientos de frío.

Resultados y su discusión

Multiplicación del GF305

Entre los tres métodos ensayados (figura 5) la germinación acelerada mediante tratamiento hormonal con BAP ha resultado ser el peor por el reducido porcentaje de germinación, produciéndose entre la prime-

ra (35% de semillas germinadas) y la cuarta semana (64%). Además las plantas obtenidas con este método presentaron frecuentemente crecimientos en roseta.

Los otros dos tratamientos ensayados presentaron un elevado porcentaje de germinación. En el caso de la eliminación de la testa la germinación fue más rápida, presentando el 73% de semillas germinadas en la segunda semana y el 95% (máximo obtenido) en la tercera semana. La estratificación a 7°C fue más lenta, comenzando a las 10 semanas (28%) y finalizando a las 14 semanas (92%). La estratificación 7°C ha sido más efectiva que la tradicionalmente utilizada a 4°C, con la cual el GF305 necesita entre 14 y 17 semanas (INRA, 1971).

Respecto a la complejidad de los métodos, la estratificación a 7°C es mucho más fácil de aplicar a la rutina, por lo que con una buena planificación de las necesidades de GF305, es el más adecuado para su utilización en el programa de mejora. En condiciones excepcionales de necesidad de material a corto plazo debemos utilizar la eliminación de la testa, debido a su eficiencia y rapidez, y a pesar de su laboriosidad.

Inoculación del GF305

Respecto a los métodos de inoculación, los que se mostraron más eficaces en cuanto al porcentaje de plantas inoculadas que mostraron síntomas fueron el injerto con chapa (80 %) y el injerto con yema (70%) de GF305 enfermo (figura 6). Es de señalar que la aparición de síntomas en todas las plantas inoculadas con éxito no sucedió hasta después del tratamiento en cámara fría, mostrándose síntomas antes del frío sólo en la mitad (figura 6). Estos porcenta-

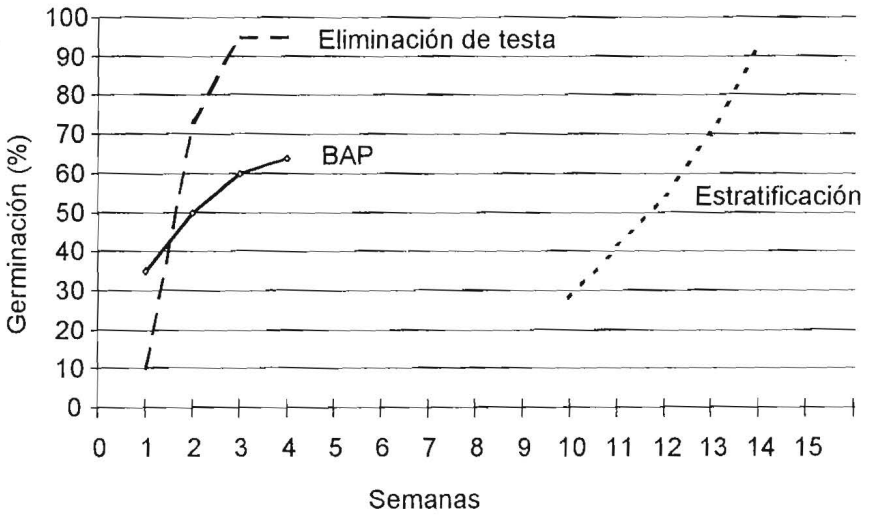


Figura 5. Obtención del GF305 mediante tres métodos diferentes. Porcentaje de semillas germinadas en función del tiempo

Figure 5. The three methods used to obtain GF305 seedlings. Seed germination percentages as function of time

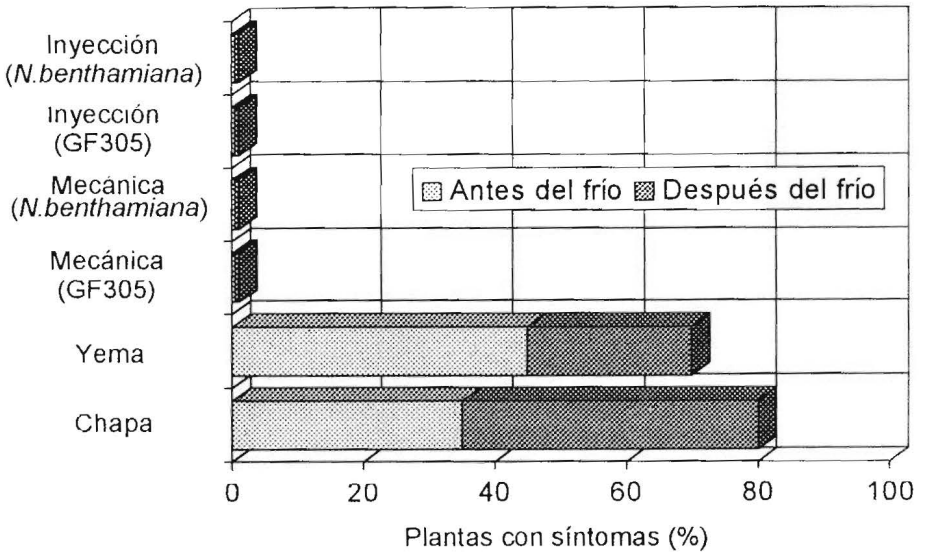


Figura 6. Inoculación del GF305 mediante 6 métodos. Porcentaje de plantas con síntomas antes y después del tratamiento de frío

Figure 6. Inoculation of the GF305 seedlings by six methods. Percentage of plants with symptoms before and after cold treatment

jes ya han sido observados con anterioridad en GF305 (DOSBA *et al.*, 1987).

La utilización de la corteza (chapa) como fuente de inóculo presenta una mayor disponibilidad pero a la vez una mayor inseguridad de haber inoculado realmente, mientras que las yemas son menos disponibles pero dan más información sobre la garantía de la inoculación cuando brotan. Este último es el sistema de inoculación más utilizado actualmente en los ensayos de resistencia (AUDERGON *et al.*, 1994).

Ninguna de las plantas inoculadas con los otros 4 métodos (inoculación mecánica y con jeringuilla, con fuente herbácea y leñosa) mostraron síntomas, luego no fueron inoculadas efectivamente (figura 6). Nuestros resultados de inoculación mecánica corroboran los de BERNHARD *et al.* (1969) que consideran que este tipo de inoculación con fuente de inóculo leñoso es únicamente viable para la inoculación de plantas herbáceas, no siendo eficaz para la inoculación de otras plantas leñosas. Sin embargo, MATERAZZI *et al.* (1991) sí consiguieron inocular mecánicamente GF305 jóvenes.

En el caso de la inoculación con jeringuilla, los resultados aportados en el trabajo de BOYÉ y DESVIGNES (1986), donde se pone de manifiesto una infección del 50% de las plantas inoculadas, no han sido obtenidos en nuestros ensayos (figura 6). DESVIGNES (1997) también describe porcentajes de hasta el 90% de inoculación de GF305 mediante jeringuilla en el caso de aislados del tipo M, mientras que en aisla-

dos del tipo D los porcentajes obtenidos por este autor no sobrepasan el 15% de plantas infectadas.

El porcentaje fallido de inoculación (entre el 20 y el 30% en el mejor de los casos) nos sugiere la necesidad de partir de un patrón (GF305 ó Real Fino) no sólo inoculado sino además mostrando síntomas, sobre el que realizar la injerta del material a evaluar, como método más efectivo en la evaluación del nivel de resistencia de las descendencias.

Injerta del albaricoquero sobre GF305

Respecto a la época de injerta, la injerta a yema dormida en febrero produjo unos porcentajes de brotación muy bajos (30%). La injerta a yema viva en mayo dio mejores resultados alcanzando el 65 %, cifra que descendió al 54% el segundo año. En general el reducido grosor de los GF305 utilizados como patrón y la poda excesiva del patrón realizada para forzar la brotación de la yema de albaricoquero afectó negativamente al desarrollo de la planta.

El estudio comparativo del porcentaje de brotación de las cuatro variedades de albaricoquero sobre GF305 y sobre Real Fino a yema viva, muestra la mejor aptitud del Real Fino (con un 64 % de yemas brotadas de media) frente al GF305 (39%) en este ensayo. Canino fue la variedad de mejor comportamiento con ambos patrones (con unos porcentajes del 80% de yemas brotadas sobre Real Fino y un 53% sobre GF305) (figura 7). Por tanto, la utilización del Real Fino (por otro lado también muy susceptible a la sharka) debe ser considerada en estudios de resistencia cuando queramos simular fielmente las condiciones naturales en campo (interacción entre la variedad y el patrón).

Los resultados nos indican que el éxito en la injerta depende de numerosos factores que afectan al patrón y a la yema injertada. Resulta evidente la necesidad de injertar sobre patrones en un estado vegetativo óptimo y un control equilibrado de la planta que permita la brotación de la yema sin alterar el desarrollo del patrón.

Ciclo de crecimiento artificial y evaluación de los descendientes

La aplicación de tratamientos de frío a las plantas aceleró la aparición de síntomas y permitió realizar dos ciclos vegetativos en un año. Sin embargo, cuando el período de permanencia en la cámara fría fue excesivo, se produjo una mortalidad importante (de hasta el 40 % en GF305). En nuestro caso 9 semanas fue el período de permanencia en cámara que dio los resultados más satisfactorios para el GF305, aunque se produjo una mortalidad del 20 %. En el caso del albaricoquero 11 semanas fue el período óptimo (con un 10% de mortalidad), mientras que períodos superiores a 13 semanas originaron una pérdida de material casi del 40%.

Respecto a la evaluación de la resistencia en las descendencias, los primeros resultados corresponden a 144 descendientes que se encuentran en su segundo ciclo (figura 8). De estos 144 descendientes, en el primer año solamente se pudieron evaluar 63 individuos, que fueron los inoculados efectivamente. De éstos, 20 mostraron síntomas (susceptibles) y 11 más dieron ELISA positivo a pesar de no manifestar síntomas (tolerantes). Las plantas "no evaluadas" hasta la fecha corresponden a aquellas sin síntomas en el GF305, no brotadas, o muertas.

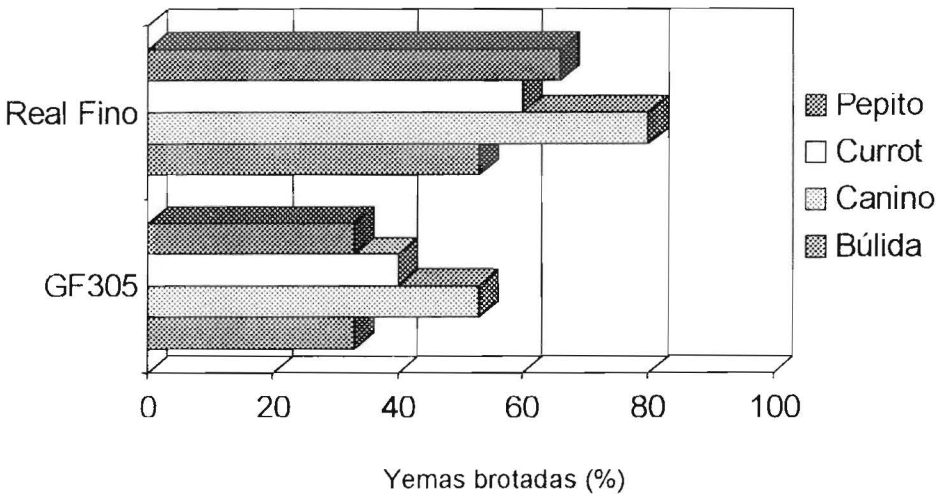


Figura 7. Porcentaje de yemas brotadas de cuatro variedades de albaricoquero injertadas sobre GF305 y albaricoquero Real Fino

Figure 7. Bud breaking percentage of four apricot cultivars grafted on GF305 peach seedlings and Real Fino apricot seedlings

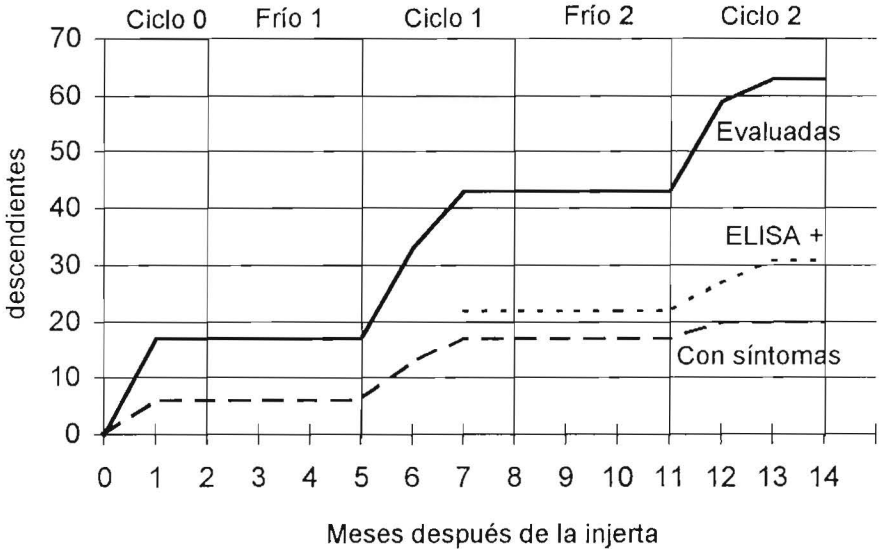


Figura 8. Evolución del número de plantas evaluadas, con síntomas y ELISA + de 144 descendientes del programa de mejora en sus ciclos 0, 1 y 2

Figure 8. The number of evaluated plants, with sharka symptoms or ELISA + out of 144 descendants of the breeding program in cycles 0, 1 and 2

Es de destacar el efecto que tiene el tiempo de estudio de los materiales en la clasificación de su nivel de resistencia, ocurriendo que materiales inicialmente clasificados como resistentes o tolerantes pueden llegar a mostrar síntomas tras varios ciclos. Por ello, la necesidad de evaluar las plantas al menos durante 4 ciclos (AUDERGON *et al.*, 1995).

DOSBA *et al.* (1994) obtuvieron en albaricoquero un 10 % de plantas con síntomas en el primer ciclo y un 34 % fueron ELISA-positivo, lo que se aproxima a nuestros resultados (12 % de plantas con síntomas y 20 % ELISA positivo).

Conclusiones

Podemos concluir, indicando que la germinación de las semillas del GF305 debe de realizarse estratificando a 7°C durante 10-14 semanas y en caso de necesidad urgente de material, mediante la eliminación de la testa (1-3 semanas).

Por otro lado, la inoculación del GF305 debe realizarse con corteza de un GF305 enfermo, y la injerta del albaricoquero debe hacerse a yema viva en el mes de mayo, sobre los patrones inoculados presentando síntomas.

El período de invierno artificial en cámara fría favorece la aparición de síntomas en las plantas sensibles inoculadas aunque puede producir cierta mortalidad cuando el tiempo de permanencia es excesivo. El periodo óptimo es de 11 semanas para el albaricoquero y 9 para el GF305. Este período artificial nos permite realizar dos ciclos de estudio al año. Finalizar señalando la necesidad de evaluar las plantas resistentes durante al menos 4 ciclos para asegurarse realmente de su nivel de resistencia.

Bibliografía

AUDERGON J.M., MORVAN G., 1990. A rapid method for assessing the sensivity of apricot to Plum pox virus. XXIII International Horticultural Congress. Firenze, 46.

AUDERGON J.M., DOSBA F., KARAYIANNIS I., DICENTA F., 1994. Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka. Bulletin EPPO, 24(3), 741-748.

AUDERGON J.M., DICENTA F., MATERAZZI A., CHASTELLIERE, M.G., 1995. Preliminary studies on the mechanisms involved in Plum Pox Virus apricot resistance. Acta Horticulturae, 384, 553-557.

BERNHARD R., MARÉNAUD C., SUTIC D., 1969. Le pêcher GF305 indicateur polyvalent des virus des espèces a noyau. Annals of Phytopathology, 1(4), 603-617.

BOYÉ R., DESVIGNES J.C., 1986. Biological techniques used for the study of new fruit virus diseases. Acta Horticulturae, 193, 261-268.

CAMBRA M., ASENSIO M., GORRIS M.T., CAMARASA E., GARCIA J.A., MOYA J.J., LÓPEZ-ABELLA D., VELA C., SANZ A., 1994. Detection of Plum pox virus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. Bulletin EPPO, 24(3), 569-578.

DESVIGNES J.C., 1997. Transmission expérimentale du virus de la sharka par injection d'un broyat de jeunes feuilles infectées. Phytoma, 490, 50-52.

DICENTA F., GARCÍA J.E., GELLA R., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., 1996. Resistencia al virus de la sharka. Un carácter a mejorar en los albaricoqueros españoles. ITEA, 92V(2): 131-143.

DOSBA F., MAISON P., LANSAC M., MASSONIÉ G., 1987. Experimental transmission of Plum pox virus to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. Journal of Phytopathology, 120, 199-204.

DOSBA F., LANSAC M., EYQUARD J.P., 1994. Résistance des *Prunus* a la sharka. Bulletin EPPO, 24(3), 691-696.

EGEA J., BURGOS L., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DICENTA F., 1997. Apricot breeding for sharka resistance at the CEBAS-CSIC, Murcia (Spain). XI Internatio-

nal Symposium on Apricot Culture. Veria (Greece). May 1997. 48.

INRA., 1971. Notes pour l'obtention du pêcher GF305 pour indexaje. Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière. Bordeaux. No publicado. 2 pp.

LLÁCER G., CAMBRA M., LAVIÑA A., 1985. Detección y primeros estudios del virus de la sharka en España. Anales INIA, Serie Agricultura. 283, 157-166.

MATERAZZI A., AUDERGON J.M., BRUCHOU C., LECOQ H., 1991. Sensibilité de sémis de pêcher GF305 a la "sharka" ou PPV. Resultats preliminaires concernant la comparison de deux types d'inoculation. 2ème Rencontre du Group Abricotier. Avignon, Mai. 1991. 147-148.

MONET R., 1983. Le pêcher. Génétique et physiologie. Ed. Masson. Paris. 133 pp.

ROUSCAS D., HUGARD J., JONARD R., VILLEMUR P., 1980. Method d'obtention de plants de pêcher GF305 sans stratification preable a basse temperature. Laboratoire d'Arboriculture Fruitière INRA du Montpellier. No publicado. 3pp.

(Aceptado para publación el 15 de junio de 1998)