ITEA (2001). Vol. 97V N.° 1, 18-25

COMPORTAMIENTO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE VARIEDADES DE ALBARICOQUERO FRENTE AL PLUM POX POTYVIRUS (SHARKA)

P. Martínez-Gómez, M. Rubio, F. Dicenta

Dpto. de Mejora y Patología Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC), Apartado 4195 30080 Murcia, España
e-mail: fdicenta@natura.cebas.csic.es

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado en condiciones *in vivo* e *in vitro* el comportamiento de 4 variedades de albaricoquero, 'Stark Early Orange' y 'Goldrich' de origen estadounidense, 'Harcot' (canadiense) y 'Real Fino' (española), frente a un aislado del virus de la sharka (plum pox potyvirus, PPV) denominado RB3.30, representativo de la población española del virus. Los resultados obtenidos muestran una buena correlación entre la evaluación *in vivo* e *in vitro*. Las variedades 'Stark Early Orange' y 'Goldrich' se mostraron resistentes mientras que la variedad 'Real Fino' se mostró susceptible. Por otro lado, 'Harcot' manifestó un comportamiento diferente, resistente en la evaluación *in vivo* y tolerante *in vitro*. La evaluación *in vitro* de la resistencia frente al PPV se muestra como un método aplicable a la rutina de un programa de mejora del albaricoquero de manera complementaria a la tradicional evaluación *in vivo*.

Palabras clave: Albaricoquero, *Prunus armeniaca* L., Sharka, Plum pox potyvirus, Resistencia, Evaluación *in vivo*, Evaluación *in vitro*.

SUMMARY

IN VIVO AND *IN VITRO* BEHAVIOUR OF APRICOT CULTIVARS TO PLUM POX POTYVIRUS (SHARKA)

In this work, the behaviour in *in vivo* and *in vitro* conditions of 4 apricot cultivars, 'Stark Early Orange' and 'Goldrich' (American), 'Harcot' (Canadian) and 'Real Fino' (Spanish), to a sharka (plum pox potyvirus, PPV) Spanish isolate was studied. The results showed a high correlation between the *in vivo* and *in vitro*, evaluation. 'Stark Early Orange' and 'Goldrich' behaved as resistance, whereas 'Real Fino' was susceptible. On the other hand, 'Harcot' behaved different, as resistant *in vivo* and tolerant in *in vitro*. The *in vitro* evaluation of resistance to PPV could be a suitable method to evaluate the resistance to PPV in apricot breeding programs as a complement to the traditional *in vivo* evaluation.

Key words: Apricot, *Prunus armeniaca* L., Sharka, Plum pox potyvirus, Resistance, *In vivo* evaluation, *In vitro* evaluation.

Introducción

La sharka, enfermedad viral producida por el plum pox potyvirus (PPV), es en la actualidad uno de los factores limitantes más importantes para el cultivo del albaricoquero en las zonas europeas afectadas (NÉMETH, 1994). Hasta la fecha, todas las variedades de albaricoquero tradicionalmente cultivadas en Europa que han sido evaluadas se han mostrado susceptibles a los diferentes aislados de este virus (KARAYIANNIS, 1989; DOSBA *et al.*, 1991; AUDERGON *et al.*, 1995). El control de la enfermedad se realiza en estos momentos mediante el arranque de los árboles enfermos y el uso de variedades certificadas libres de virus. Estas medidas reducen la dispersión del virus aunque sin garantizar su erradicación (DICENTA *et al.*, 1999), por lo que el cultivo de variedades resistentes es la única solución definitiva para el control de la enfermedad (AUDERGON *et al.*, 1994; POLÁK *et al.*, 1995).

Las fuentes de resistencia descritas originalmente fueron variedades procedentes de Norte América. Estas variedades presentan en su mayoría una serie de características negativas (autoincompatibilidad floral, frutos de poca calidad, grandes necesidades de frío) que no permiten su cultivo en las principales zonas de producción europeas. Por tanto, la obtención de nuevas variedades resistentes al PPV es uno de los principales objetivos de la mejora genética del albaricoquero en toda Europa (AUDERGON *et al.*, 1994; POLÁK *et al.*, 1995; EGEA *et al.*, 1999).

La evaluación de la resistencia es uno de los aspectos claves en los programas de mejora genética del albaricoquero para resistencia al PPV. En las zonas europeas con altos niveles de infección como Centro y Este de Europa o Grecia, esta evaluación de la resistencia se realiza en campo en condiciones de infección natural (KARAYIANNIS, 1989; POLÁK *et al.*, 1997), mientras que en los países donde la enfermedad se encuentra menos extendida, como Francia o España, se realiza en condiciones controladas en invernaderos a prueba de insectos (AUDERGON *et al.*, 1994; MARTÍNEZ-GÓMEZ y DICENTA, 1998).

Este trabajo tiene como objetivo comparar el comportamiento *in vivo* e *in vitro* del

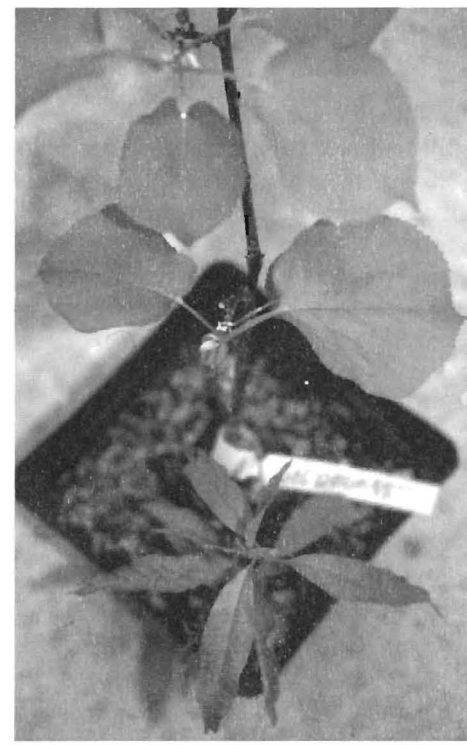


Figura 1. Variedad 'Goldrich' injertada sobre melocotonero GF305 inoculado con el PPV. Es posible observar la ausencia de síntomas de PPV en esta variedad frente a los cuantiosos síntomas que presenta el GF305.

Figure 1. 'Goldrich' cultivar grafted onto GF305 peach inoculated with PPV. It is posible to see the absence of sharka symptoms in the cultivar in front of the strong symptoms showed by the GF305.

nivel de resistencia de 4 variedades de albaricoquero de interés para su utilización en los programas de mejora frente a un aislado del PPV representativo de la población existente en España.

Material y métodos

Material vegetal

Las variedades de albaricoquero ensayadas fueron las de origen estadounidense 'Stark Early Orange' y 'Goldrich', la canadiense 'Harcot', y la española 'Real Fino'. Como patrón se utilizaron plantas procedentes de semillas de melocotonero 'GF305', caracterizado por su elevada susceptibilidad al PPV y muy utilizado como patrón susceptible en los ensayos de evaluación de la resistencia al PPV de diversos *Prunus* (AUDERGON y MORVAN, 1990; GABOVA, 1994).

Aislado ensayado

Como fuente del PPV se utilizó el aislado RB3.30, aislado Tipo Dideron procedente de la colección de aislados del IVIA de Valencia, obtenido en España a partir de ciruelo 'Red Beaut' y mantenido en melocotonero 'GF305'. Este aislado es considerado representativo de la población española de aislados de PPV (ASENSIO, 1996).

Evaluación *in vivo* del nivel de resistencia

La evaluación *in vivo* del nivel de resistencia se realizó aplicando el método descrito por MARTÍNEZ-GÓMEZ y DICENTA (1998), en condiciones controladas en invernadero a prueba de insectos, utilizando como patrón susceptible el melocotonero 'GF305'. Diez repeticiones de cada variedad fueron injertadas sobre el patrón previamente inoculado mediante injerto de corteza con el PPV. Las plantas fueron sometidas a dos ciclos de crecimiento artificial al año, con periodos de cuatro meses de cultivo en invernadero y aplicación de periodos de letargo artificial de dos meses en cámara fría a 7°C y oscuridad.

La presencia de síntomas en el patrón GF305 fue indicativa de la eficiente inoculación del virus, en caso contrario fue necesario repetir esta inoculación. La eva-



Figura 2. Variedad 'Goldrich' microinjertada *in vitro* sobre melocotonero GF305 inoculado con el PPV.

Figure 2. 'Goldrich' cultivar in vitro micrografted onto GF305 peach inoculated with PPV.

Cuadro 1. Comportamiento *in vivo* de las variedades de albaricoquero estudiadas frente al PPV

Table 1. In vivo *behaviour of studied apricot cultivars to PPV*

Variedad	Plantas ensayadas	Plantas evaluadas (a)	Ciclo 1		Ciclo 2	
			Síntomas (b)	ELISA (c)	Síntomas (b)	ELISA (c)
'SEO'*	10	5	0 (0)	0 (0,21)	0 (0)	0 (0,25)
'Goldrich'	10	5	0 (0)	0 (0,28)	0 (0)	0 (0,24)
'Real Fino'	10	5	4 (2,3)	4 (1,55)	5 (2,3)	5 (1,68)
'Harcot'	10	4	0 (0)	0 (0,27)	0 (0)	0 (0,23)

(*) Stark Early Orange.

(a) Plantas en las cuales la inoculación fue efectiva, el patrón mostró síntomas de sharka y dio ELISA+, y se produjo la brotación de las yemas de albaricoquero injertadas.

(b) Número de plantas con síntomas (intensidad media de estos síntomas, utilizando una escala de 0 –ausencia de síntomas– a 5 –máxima intensidad–).

(c) Número de plantas ELISA+ (Densidad Óptica -DO- media del ELISA a 405 nm a los 60' de las plantas enfermas. DO del albaricoquero sano control = 0,22).

luación del comportamiento o nivel de resistencia frente al PPV de las variedades ensayadas, se realizó mediante la observación de síntomas en hoja en cada ciclo de estudio dos meses después de la salida de la cámara fría, utilizando una escala entre 0 (ausencia de síntomas) y 5 (máxima intensidad de síntomas). Para verificar la presencia o ausencia del virus, se aplicó la prueba ELISA-DASI con anticuerpos monoclonales 5B-IVIA específicos de PPV, realizando lecturas de Densidad Óptica (DO) a 405 nm a los 60´ (CAMBRA *et al.*, 1994).

De acuerdo con el criterio descrito por AUDERGON *et al.* (1994), las plantas que manifestaron síntomas se consideraron susceptibles, las que no mostraron síntomas pero dieron ELISA+ fueron consideradas tolerantes, mientras que las que no mostraron síntomas ni dieron ELISA+ fueron consideradas resistentes.

Evaluación *in vitro* del nivel de resistencia

En el método de evaluación *in vitro* ensayado se utilizaron como micropatrones plantas procedentes de semillas de 'GF305' germinadas *in vitro* mediante estratificación a 7°C en tubos de ensayo durante 10 semanas, y posterior cultivo durante 4 semanas en cámara a 22°C y un fotoperiodo de 16 horas. Como fuente de inóculo se introdujeron tallos enfermos de 'GF305' que mostraban claros síntomas de le enfermedad y fueron brotados *in vitro*. Cuando los 'GF305' usados como micropatrones tenían una altura de 3 cm y un grosor de 2-3 mm, fueron inoculados mediante microinjerto con una yema recién brotada procedente de tallos previamente introducidos como fuente de inóculo y brotados *in vitro*. Dos semanas después de la inoculación, estos micropatrones inoculados fueron microinjertados

Cuadro 2. Comportamiento *in vitro* de las variedades de albaricoquero estudiadas frente al PPV

Table 2. In vitro *behaviour of studied apricot cultivars to PPV*

Variedad	Plantas ensayadas	Plantas evaluadas (a)	Síntomas (b)	ELISA (c)
'SEO'*	10	5	0 (0)	0 (0,19)
'Goldrich'	10	6	0 (0)	0 (0,25)
'Real Fino'	10	4	2 (1,0)	4 (0,68)
'Harcot'	10	6	0 (0)	2 (0,60)

(*) Stark Early Orange.

(a) Plantas en las cuales la inoculación fue efectiva, la fuente de inóculo microinjertada dio ELISA+ y se produjo el desarrollo de las yemas de albaricoquero microinjertadas.

(b) Número de plantas con síntomas (intensidad media de estos síntomas, utilizando una escala de 0 –ausencia de síntomas– a 5 –máxima intensidad–).

(c) Número de plantas ELISA+ (Densidad Óptica –DO– media del ELISA a 405 nm a los 60' de las plantas enfermas. DO del albaricoquero sano control 0,24).

con una yema recién brotada de la variedad de albaricoquero a evaluar también procedente de tallos previamente introducidos y brotados *in vitro*.

Al igual que en la evaluación *in vivo*, la presencia de síntomas o ELISA+ de la yema microinjertada como fuente de inóculo fue indicativa de la eficiente inoculación, en caso contrario fue necesario repetir la inoculación. La evaluación del comportamiento frente al PPV, se realizó mediante la observación de síntomas en hoja de la variedad un mes después de ser microinjertada sobre el patrón, utilizando también una escala entre 0 (ausencia de síntomas) y 5 (máxima intensidad de síntomas). Para verificar la presencia o ausencia del virus, se aplicó la prueba ELISA-DASI (CAMBRA *et al.*, 1994), aplicando también como criterio descrito para caracterizar este comportamiento el descrito por AUDERGON *et al.* (1994).

Resultados y su discusión

Los resultados obtenidos en la evaluación de la resistencia *in vivo* e *in vitro* de las variedades estudiadas muestran una buena correlación entre ambos métodos de evaluación. En el caso de las variedades 'Stark Early Orange', 'Goldrich' y 'Real Fino' el comportamiento fue similar, mientras que 'Harcot' mostró un comportamiento diferente en los dos métodos de evaluación.

Las variedades, 'Stark Early Orange' y 'Goldrich' (figura 1) fueron clasificadas *in vivo* como resistentes al aislado ensayado, después de los 2 ciclos de estudio no mostraron síntomas ni dieron ELISA+ ninguna de las repeticiones evaluadas (cuadro 1). También se mostraron resistentes en el ensayo *in vitro* no mostrando síntomas ni dando ELISA+ ninguna de las repeticiones evaluadas (cuadro 2).

'Stark Early Orange' fue una de las primeras variedades descritas como resistentes a aislados Tipo M de PPV (SYRGIANNIDIS, 1980), y posteriormente ha sido también descrita como resistente por diferentes autores, incluso tras ser injertada sobre árboles adultos muy enfermos (KARAYIANNIS, 1989; DOSBA *et al.*, 1991; AUDERGON *et al.*, 1994; 1995; KARAYIANNIS y MAINOU, 1994). Sin embargo, recientemente, algunos autores han observado síntomas en hojas de esta variedad después de la injerta sobre árboles enfermos de sharka infectados con aislados del virus Tipo M (POLÁK *et al.*, 1995; 1997; BALAN y STOIAN, 1995).

'Goldrich' ha sido clasificada también como resistente a aislados Tipo D y M en condiciones de infección natural e invernadero por DOSBA *et al.*, (1991), KARAYIANNIS y MAINOU (1994) AUDERGON *et al.* (1995). Sin embargo, en ensayos sobre árboles enfermos también con aislados Tipo M se ha observado presencia de síntomas y ELISA+ (POLÁK *et al.*, 1995; 1997). Estos aislados Tipo M han sido descritos como más agresivos en albaricoquero que los aislados Tipo D (QUIOT *et al.*, 1995) utilizados en este ensayo.

Esta resistencia mostrada *in vivo* e *in vitro* por la variedad 'Goldrich' frente al aislado ensayado, representativo de los aislados españoles, además del buen comportamiento agronómico observado en este país por 'Goldrich' entre las variedades resistentes ensayadas, pondría de manifiesto el interés de estas variedades como fuente de resistencia para ser utilizadas en programas de mejora en España (EGEA *et al.*, 1999).

La variedad 'Real Fino' se mostró susceptible al aislado ensayado tanto en los ensayos *in vivo* como *in vitro*. Observamos que después de dos ciclos de estudio en condiciones *in vivo* (cuadro 1), y después de la inoculación *in vitro* (cuadro 2), el 100% de las plantas evaluadas manifestaron síntomas o fueron ELISA+. Esta variedad también ha sido recientemente descrita como susceptible en ensayos realizados en condiciones controladas *in vivo* sobre patrón albaricoquero franco (MARTÍNEZ-GÓMEZ y DICENTA, 1999).

En el ensayo en condiciones *in vitro*, podemos observar como en el caso de esta variedad susceptible, 2 de las repeticiones evaluadas que dieron ELISA+ no manifestaron síntomas (cuadro 2). Además, la intensidad de los síntomas manifestados por esta variedad susceptible fue mucho menor *in vitro* (1.0) (cuadro 2) que la observada en condiciones *in vivo* (2.3) (cuadro 1). Se pone así de manifiesto la dificultad de observación de los síntomas en las condiciones *in vitro*, consecuencia del característico desarrollo de las plantas en tubo de ensayo (figura 2), no debiendo confundir esta dificultad en la observación de síntomas con el concepto de tolerancia descrito por AUDERGON *et al.* (1994) como un nivel intermedio entre susceptibilidad y resistencia.

Por tanto, la prueba ELISA es imprescindible para determinar el estado de infección de los materiales en estas condiciones *in vitro*. Los resultados de Densidad Óptica obtenidos en las plantas enfermas de 'Real Fino' también fueron menores en las condiciones *in vitro* (0,68) (cuadro 2) frente a los observados *in vivo* (1,68) (cuadro 1) fruto probablemente también de las condiciones de desarrollo de las plantas en tubo de ensayo.

En cuanto a la caracterización de los síntomas observados en 'Real Fino', en el ensayo *in vivo* se apreció una distribución irregular de los síntomas en la planta, observándose clorosis nerviales y manchas cloróticas en hojas además de un rizado de las mismas, síntomas típicos descritos ante-

riormente en albaricoquero por PELET y BOVEY (1968). Los síntomas observados *in vitro*, menos intensos y más irregulares, consistieron en una clorosis nervial con un rizado muy suave de las hojas.

Finalmente, 'Harcot' se mostró resistente en el ensayo *in vivo*, ya que después de 2 ciclos de estudio ninguna de las 4 repeticiones bien inoculadas mostró síntomas ni dieron ELISA+. Por otro lado, en condiciones *in vitro*, la variedad no mostró síntomas pero sí ELISA+ en 2 de las 6 repeticiones evaluadas (cuadro 2). Estos datos del comportamiento de 'Harcot' *in vitro* indicaría una tolerancia *in vitro* al aislado Tipo D ensayado. 'Harcot' ha sido descrita como resistente frente a aislados Tipo M y D (DOSBA *et al.*, 1991; AUDERGON *et al.* 1994). Sin embargo, otros autores han observado síntomas después de varios años de estudio con aislados Tipo M y D (KARAYIANNIS, 1989; AUDERGON *et al.*, 1995; POLÁK *et al.*, 1995; 1997). Estos últimos datos pondrían de manifiesto la susceptibilidad de esta variedad a los aislados Tipo D manifestada en nuestros ensayos en condiciones *in vitro*.

Podemos concluir indicando que la evaluación en condiciones *in vitro* presenta la gran ventaja de una respuesta mucho más rápida de los materiales evaluados, si bien, los resultados observados en la manifestación de síntomas y la DO del ELISA en estas condiciones son peores que los resultados obtenidos *in vivo*. La evaluación *in vitro* de la resistencia, pues, puede ser un complemento a la tradicional evaluación *in vivo* ya que supone un ahorro de espacio y acortamiento del proceso de evaluación. La evaluación *in vitro* seria utilizable en los programas de mejora del albaricoquero como primera etapa, aunque siendo necesario posteriormente contrastar los resultados obtenidos con los de la evaluación tradicional *in vivo*.

Bibliografía

AUDERGON J.M., MORVAN G., 1990. A rapid method for assessing the sensivity of apricot to Plum Pox Virus. 2ème Rencontres de Virologie Vegetale. Aussois (France), January 1989, 13.

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., GARCÍA J.E., KARAYIANNIS I., MONASTRA F., JORGE O., 1995. Amélioration varietale qualitative et sanitaire de l'abricotier èspece fruitière non excedentaire pour la diversification cultural des zones mediterraneénnes en cultures séches et irriguées. Final Rapport of European Project CT 90 0016.

ASENSIO M., 1996. El virus de la sharka (plum pox virus): Caracterización, diagnostico y detección mediante anticuerpos monoclonales especificos. Tesis Doctoral. Universidad Valencia.

BALAN V., STOIAN E., 1995. Susceptibility of certain apricot-tree to the plum pox virus pathogenic action. Acta Horticulturae, 384, 565-569.

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

DICENTA F., PÉREZ-CAMPOY P., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., GARCÍA BRUPTON J., BOTELLA M.A., 1999. Natural spread of sharka disease in fruit tree orchards in Murcia (Spain). Acta Horticulturae, 488 (2), 769-773.

DOSBA F., DENISE F., MAISON P., MASSONIE G., AUDERGON J.M., 1991. Plum Pox Virus resistance of apricot. Acta Horticulturae, 293, 569-579.

EGEA J., BURGOS L., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DICENTA F., 1999. Apricot breeding for sharka resistance at the CEBAS-CSIC. Murcia (Spain). Acta Horticulturae, 488 (1), 153-157.

GABOVA R., 1994. Evaluation of peach and nectarine cultivars in Bulgaria for their resistance to plum pox potyvirus. Bulletin EPPO, 24 (3), 755-760.

KARAYIANNIS I., 1989. Susceptibility of apricot cultivars to Plum pox virus in Greece. Acta Horticulturae, 235, 271-274.

KARAYIANNIS I., MAINOU A., 1994. Resistance to plum pox virus in apricots. Bulletin EPPO, 24 (3), 761-766.

MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DICENTA F., 1998. Evaluación de la resistencia al virus de la sharka (Plum pox potyvirus) en albaricoquero. ITEA, 94 (2), 76-88.

MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DICENTA F., 1999. Susceptibility of Spanish apricot cultivars to sharka (plum pox potyvirus). Phytopahologia Mediterranea, 38, 122-125.

NÉMETH M., 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. Bulletin EPPO, 24 (3), 525-537.

PELET F., BOVEY R., 1968. Les symptomes de la Sharka sur les pruniers, pruneautiers, abricotiers et pèches. Agriculture Romande, 7, 80-84.

POLÁK J., CHOD J., OUKROPEC I., KRSKA B., PÍVALOVÁ J., JANSTA Z., 1995. Virological programme in breeding of apricots for resistance to Plum pox virus in the Czech Republic. Acta Horticulturae, 384, 581-584.

POLÁK J., OUKROPEC I., KOMINEK P., KRSKA B., BITTÓOVÁ M., 1997. Detection and evaluation of resistance of apricots and peach to plum pox virus. Journal of Plant Diseases and Protection, 104, 466-473.

QUIOT J.B., LABONNE G., BOEGLIN M., ADAMOLLE C., RENAUD L.Y., CANDRESSE T., 1995. Behaviour of two isolates of Plum pox virus inoculated on peach and apricot trees. Firts results. Acta Horticulturae, 386, 290-294.

SYRGIANNIDIS G., 1980. Selection of two apricot varieties resistant to sharka virus. Acta Phytopathologica Scientiarum Hungaricae, 15, 85-87.

(Aceptado para publicación el 30 de octubre de 2000)