DETECCIÓN DEL MOVIMIENTO ESTACIONAL DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL DECAIMIENTO DEL PERAL

J.I. Hormaza
V. Aguelo
P. Errea
Unidad de Fruticultura. S.I.A.-D.G.A.
Apdo 727. 50080 Zaragoza

Introducción

El "Pear Decline" o decaimiento del peral está causando graves problemas en plantaciones de diferentes variedades de esta especie injertadas sobre distintos patrones en el Valle del Ebro (Hormaza et al., 1999). El agente causal de esta enfermedad es un fitoplasma cuya transmisión se puede realizar mediante injerto y a través de pequeños insectos chupadores conocidos como silas o mieletas del peral del género *Cacopsylla*. La distribución del fitoplasma en las plantas enfermas parece estar limitada al floema. Estudios realizados mediante el seguimiento de los fitoplasmas al microscopio sugirieron que la colonización de la parte aérea de los árboles enfermos por parte de los fitoplasmas tiene fluctuaciones estacionales (Seemüller et al., 1984). Según este esquema, los fitoplasmas responsables de la enfermedad emigran de la parte aérea durante el invierno y se acumulan en la raíz del patrón, donde pasarían el invierno para volver a colonizar la parte aérea en la primavera siguiente, por lo que la propagación de material vegetal mediante injerto utilizando yemas en estado de parada vegetativa evitaría la propagación de la enfermedad. Sin embargo, el estudio de esta enfermedad presenta varios problemas que incluyen el que su sintomatología sea muy poco específica y, frecuentemente, se presente cuando la enfermedad está ya demasiado avanzada y que el patógeno presente una distribución errática en la planta.

El desarrollo en los últimos años de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite una detección más fiable del patógeno causante de la enfermedad y, por tanto, se puede estudiar en mayor profundidad el movimiento del fitoplasma en la planta. Precisamente, la aplicación de estas técnicas ha detectado, en el caso de ciruelo y albaricoquero, la presencia de fitoplasmas en crecimientos anormales de hojas durante el periodo de reposo (Jarausch et al., 1999). El objetivo de este trabajo es estudiar la distribución del fitoplasma en distintos árboles enfermos de decaimiento del peral durante el periodo de crecimiento y de reposo vegetativo.

Por otra parte, como el hecho de que se detecte una presencia del patógeno en el invierno en la parte aérea del árbol no implica necesariamente que el patógeno sea viable y capaz de multiplicarse, se han utilizado yemas obtenidas de ramas enfermas para establecer cultivos *in vitro* y para injertarlas sobre árboles sanos. La comprobación de este hecho es de vital importancia puesto que si el patógeno no es viable en invierno se podría recomendar el injerto únicamente con yemas recogidas durante los meses de reposo invernal; en caso contrario, se debería reducir al máximo la utilización del injerto cuando no se conozca con seguridad la ausencia del fitoplasma causante del decaimiento del peral.

Materiales y Métodos

Se están utilizando 3 árboles enfermos de las variedades 'Limonera', 'Monsallard' y 'Magallón' de las que se toman muestras a intervalos quincenales. Se comenzó la toma de muestras en otoño, para lo que se marcaron en cada árbol 5 niveles en altura, siendo el nivel 1 el inferior y el 5 el superior, y se extrajo ADN del floema de las ramas tras la eliminación de los tejidos muertos de la corteza; el proceso de toma de muestras continúa aunque una vez producida la brotación de las nuevas hojas en primavera se extrae el ADN tanto de las ramas como de las hojas, siguiendo una metodología descrita previamente (Hormaza et al., 1994). Posteriormente el ADN se somete a un proceso de amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando cebadores universales que amplifican un fragmento de ADN de cualquier fitoplasma. Posteriormente mediante "nested PCR" se reamplifican las muestras amplificadas utilizando cebadores específicos para el fitoplasma causante del decaimiento del peral (Lorenz et al., 1995). Como control sano se utilizan plantas del patrón Kirshenschaller cultivadas *in vitro* a partir de semillas. Las reacciones de amplificación se realizan 3 veces para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Por otra parte, se han establecido *in vitro* muestras de ramas de las variedades 'Limonera', 'Williams', 'Magallón' y 'Monsallard' en las que se detectó la presencia del patógeno. Las muestras fueron tomadas en tres épocas distintas, considerando distintos estados del desarrollo de la yema, en primavera, al final del verano y a la salida del invierno. El establecimiento in vitro se realizó en medio de Murashige y Skoog (MS) suplementadas con 2.25 ppm de BAP, 0,1 ppm de GA3 y 0,1ppm de IBA. Las plantas fueron repicadas cada 4 semanas y testadas con PCR después de 3 meses del inicio del cultivo.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos durante el primer año de estudio indican que el patógeno es detectable en el árbol durante todo el periodo de reposo vegetativo, al menos en algunos de los niveles en los que se han dividido los árboles estudiados (Tabla 1). Sin embargo, en algunos de los niveles no se detecta el patógeno en todas las fechas estudiadas lo que probablemente se explique por la distribución errática del fitoplasma en la planta. A partir de marzo las muestras con resultados negativos son más frecuentes, lo que se podría explicar por el hecho de que las nuevas hojas producidas en primavera pueden no presentar todavía fitoplasmas hasta que se produzca su colonización desde la madera antigua. Aunque diferentes estudios indicaban que el fitoplasma causante de esta enfermedad era incapaz de sobrevivir al invierno debido a la degeneración del floema en la parte aérea, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que este puede no ser el caso; quizás la degeneración del floema no sea total en zonas o en años con inviernos menos extremos o quizás los fitoplasmas sean capaces de sobrevivir en vasos degenerados.

Por otra parte, el cultivo *in vitro* de yemas procedentes de ramas enfermas tomadas en primavera y al final del verano, ha dado lugar a plantas en las que no se ha detectado la presencia del fitoplasma mediante PCR, lo cual indica que, o bien el fitoplasma no había colonizado las yemas recogidas para el cultivo *in vitro*, o bien dicho fitoplasma no ha podido sobrevivir durante el desarrollo de la planta *in vitro*, aunque estos resultados se complementarán cuando se disponga de los análisis de las plantas desarrolladas *in vitro* a partir de yemas tomadas en invierno.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el fitoplasma causante del decaimiento del peral puede sobrevivir en la parte aérea de plantas enfermas durante el invierno en nuestras condiciones de cultivo; no obstante, estos datos se complementarán con estudios en años sucesivos y con resultados de transmisión tanto mediante injerto en el campo como *in vitro*.

Bibliografía

Hormaza, J.I., P. Errea, M. Carrera, R. Balduque, C. Lozano, R. Gella (1999) El decaimiento del peral. Surcos de Aragón 62: 27-29.

Hormaza, J.I., L. Dollo, V.S. Polito (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theoretical and Applied Genetics 89: 9-13.

Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F. (1999) Seasonal colonization pattern of European Stone Fruit Yellows Phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. Journal of Phytopathology 147: 47-54.

Lorenz, K.H., B. Schneider, U. Ahrens, E. Seemüller (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85: 771-776.

Seemüller, E.U., Schaper, U., Zimbelmann, F. (1984) Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasmalike organisms associated with apple proliferation and pear decline. Z. PflKrankh. PflSchutz. 91: 371-382

Tabla 1

Movimiento estacional del fitoplasma causante del Decaimiento del Peral en 5 niveles de 3 variedades. Las muestras en las que se ha detectado la presencia del patógeno mediante PCR están indicadas como +. Las fechas seguidas de un asterisco corresponden a muestras tomadas de hojas; el resto a muestras tomadas de madera.

	4/11	22/11	17/12	3/1	18/1	2/2	17/2	3/3	17/3	3/4	3/4 *	19/4	19/4 *
Monsallard													
Nivel 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Nivel 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Nivel 3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	fd	-	+
Nivel 4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	fd	+	fd
Nivel 5	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Limonera													
Nivel 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Nivel 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Nivel 3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nivel 4	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	fd	+	-
Nivel 5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Magallón													
Nivel 1	fd	fd	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Nivel 2	fd	fd	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nivel 3	fd	fd	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Nivel 4	fd	fd	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Nivel 5	fd	fd	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-

fd: falta de datos